

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração:
Engenharia de Processos

**Adsorção de Beta-Galactosidase de *Scopulariopsis sp.* em
Resina Trocadora de Íons Objetivando a Purificação e a
Ampliação de Escala**

Autor

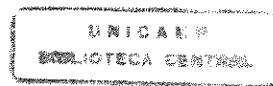
José Antonio Marques Pereira

Orientador

Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

**Campinas - São Paulo
Novembro de 1999**



UNIDADE	YBC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	P414a
V.	Ex
TOMOS	80/40133
PREÇO	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/01/00
N.º CPD	

CM-00138050-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

P414a

Pereira, José Antonio Marques

Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis sp.*
Em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a
ampliação de escala / José Antonio Marques Pereira.--
Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Adsorção. 2. Beta-galactosidase. 3. Troca iônica.
4. Enzimas - Purificação. 5. Modelos matemáticos. I.
Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

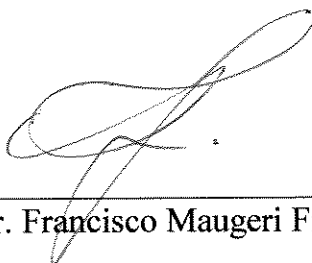
Tese de Doutorado defendida e aprovada em 23 de novembro de 1999 pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:



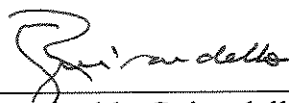
Profº Dr. Cesar Costapinto Santana



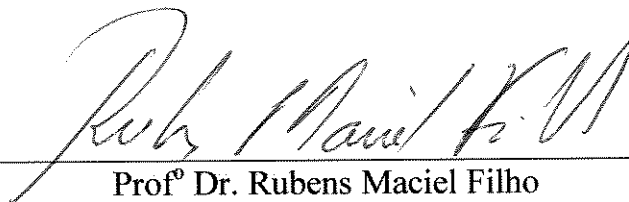
Profº Dr. Frederico José Vieira Passos



Profº Dr. Francisco Maugeri Filho

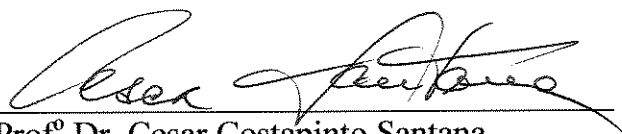


Profº Dr. Reginaldo Guirardello



Profº Dr. Rubens Maciel Filho

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por José Antonio Marques Pereira e aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de novembro de 1999.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cesar Costapinto Santana', is written over a horizontal line.

Profº Dr. Cesar Costapinto Santana
Orientador

À minha esposa, Ana Lúcia , e ao meu pai, Antonio.
(*in memoriam*)

À minha mãe, Maria, e aos meus filhos
Pedro Paulo e Ana Carolina.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Cesar Costapinto Santana pela orientação, amizade, relacionamento humano, e oportunidade de realização deste trabalho na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pelo incentivo à realização do doutorado.

À CAPES - PICDT pelo apoio financeiro relativo à concessão da bolsa de doutorado.

À professora Maria Helena Andrade Santana pela concessão do uso de laboratório, e participação no meu segundo exame de qualificação.

À professora Glaucia Maria Pastore pela concessão do uso de laboratório, e também pelo auxílio pessoal durante a produção da enzima.

Ao professor Reginaldo Guirardello pela disposição em discutir detalhes à respeito da modelagem matemática, sua participação na banca de defesa da tese, e sugestões apresentadas.

Ao professor Rubens Maciel Filho pela participação no meu segundo exame de qualificação, banca de defesa da tese, e, ainda, pelas sugestões apresentadas.

Às professoras Sonia Maria Alves Bueno e Angela Maria Moraes pela participação no meu primeiro exame de qualificação.

Aos companheiros Fábio Ribeiro Campos da Silva e Eduardo Arruda pela amizade, convivência, e auxílio nas atividades do dia-a-dia no Laboratório de Biosseparações.

Aos colegas de Faculdade, em especial a: Marisa, Mariana, Joel, Cesar, Adriano, Denise, Vinicius, Elcimar, Libia, Sandra, Luciana, Rosana, Rodrigo, Eduardo Urso.

Ao amigo Salah pelo auxílio na elaboração do resumo em inglês.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, Luis Antonio Minim e Jane Selia dos Reis Coimbra, pela amizade, e apoio durante meu período de afastamento.

Aos meus irmãos Marco Antonio e João Flávio, e suas esposas Marli e Luciana, pelo apoio durante a realização do doutorado.

Um agradecimento especial à vó Maria, minha mãe, pelo dedicação em tempo integral, sem a qual seria impossível a minha dedicação ao doutorado.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química, e, em especial, à Dona Cacilda, pelos cafezinhos, e Alexandre pelo pronto atendimento na solução de problemas de manutenção do laboratório.

Ao Dr. Claudino Marçal Marques pelo emprego e bolsa no Curso Objetivo de Ribeirão Preto(em 1973), que permitiram o início de meus estudos rumo à Universidade.

SUMÁRIO

NOMENCLATURA	i
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Escopo	1
1.2 Objetivos	4
CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Enzimas	7
2.1.1. β -Galactosidase	8
2.1.2. Fontes da Enzima β -Galactosidase	8
2.2. Produção de Enzimas por Cultivo em Substrato Sólido	10
2.3. Estratégia para a Concentração e Purificação de Proteínas	11
2.3.1. Ordenação das Técnicas.....	13
2.4. Aspectos Gerais dos Processos Cromatográficos	14
2.4.1. A Matriz do Trocador de Íons	17
2.4.2. Adsorção de Proteínas em Resinas Trocadoras de íons	19
2.4.3. Tampões Usados em Troca Iônica	21
2.4.4. Seleção do pH e da Força Iônica para Adsorção e Eluição	22
2.4.5. Adsorção e Eluição em Leitos de Resinas	22
2.4.6. Cromatografia por Exclusão ou Filtração em Gel	24
2.5. Eletroforese	24
2.6. Purificação de β -Galactosidase	25
2.7. Purificação de Enzimas Produzidas em Substrato Sólido	28
2.8. Isoterma de Adsorção e Capacidade do Adsorvente	31
2.9. Modelos Matemáticos Aplicados à Adsorção	34
2.9.1. Adsorção em Tanques Agitados	34
2.9.1.1. Modelo de Adsorção com Cinética a Taxa Constante	34
2.9.1.2. Modelo com Transferência de Massa no Filme e Difusão nos Poros	35
2.9.1.3. Balanço de Massa na Partícula	36
2.9.1.4. Balanço de Massa na Fase de Líquido	38
2.9.2. Adsorção em Coluna Cromatográfica	38
2.9.2.1. Modelo Simplificado para a Coluna	40
2.10. Escoamento da Fase de Líquido numa Coluna Cromatográfica	42
2.10.1. Distribuição do Tempo de Residência	43

2.10.2. Análise da Distribuição dos Tempos de Residência	45
2.10.3. Aplicação do Método das Duas Medidas	47
2.10.4. Modelo de Escoamento com Dispersão	48
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. Produção de β -Galactosidase de <i>Scopulariopsis sp.</i>	53
3.2. Determinação de Atividade da β -Galactosidase	55
3.3. Determinação da Concentração de Proteína Total	56
3.4. Preparo de Soluções Contendo β -Galactosidase	56
3.5. Isoterma de Adsorção de β -Galactosidase	58
3.6. Cinética de Adsorção em Tanque Agitado	60
3.7. Adsorção em Coluna Cromatográfica	60
3.8. Filtração em Gel	61
3.9. Eletroforese SDS-PAGE em Gel de Poliacrilamida	61
3.10. Caracterização do Leito de Partículas	62
3.11. Solução do Modelo de Adsorção em Tanque Agitado	65
3.12. Solução do Modelo de Adsorção em Coluna Cromatográfica	66
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. Porosidade da resina Accell® Plus QMA	67
4.2 Estudo da Expansão do Leito de Accell® Plus QMA	69
4.3. A Enzima β -Galactosidase Produzida	70
4.4. Ensaio de Atividade da β -Galactosidase	71
4.5. Ensaios Preliminares de Adsorção	73
4.6. Adsorção e Eluição em Leito Fixo e Expandido	73
4.7. Ensaios de Adsorção com Solução Ultrafiltrada	76
4.7.1. Isotermas de Adsorção de Proteína e de Atividade	76
4.7.2. Curvas Cinéticas de Adsorção em Tanque Agitado	80
4.7.3. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica	84
4.8. Ensaios de Adsorção com Material Precipitado em Acetona	89
4.8.1. Isotermas de Adsorção de Proteína e de Atividade	89
4.8.2. Curvas Cinéticas de Adsorção em Tanque Agitado	92
4.8.3. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica	95
4.9. Ensaios de Adsorção com Material Precipitado em Acetona e Ultrafiltrado	99
4.9.1. Isotermas de Adsorção de Proteína e de Atividade	99
4.9.2. Curvas Cinéticas de Adsorção em Tanque Agitado	101
4.9.3. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica	103
4.10. Uso de Diálise para Preparo de Solução	105
4.10.1. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica	106
4.11. Filtração em Gel	108
4.12. Modelagem da Adsorção em Tanque Agitado	108
4.12.1. Solução Numérica do Modelo	108

4.12.2. Resultados da Modelagem da Adsorção em Tanque Agitado	111
4.12.2.1. Cálculo das Constantes de Associação e de Dissociação	111
4.12.2.2. Cálculo dos Parâmetros de Transferência de Massa	114
4.13. Modelagem da Adsorção em Coluna Cromatográfica	117
4.13.1. Solução Numérica do Modelo	117
4.13.2. Resultado da Solução Numérica do Modelo de Adsorção em Coluna Cromatográfica	120
4.13.3. Resultado do Modelo de Thomas para a Adsorção em Coluna Cromatográfica.....	121
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	125
5.1 Conclusões	125
5.2. Sugestões	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

NOMENCLATURA

A	Matriz de colocação ortogonal	
A_c	Área da seção transversal da coluna	(cm ²)
B	Matriz de colocação ortogonal	
B_{im}	Número de Biot de massa($k_f R / \varepsilon_i D_{ef}$)	adimensional
C	Concentração de adsorvato na fase de líquido	(mg.mL ⁻¹)
C_b	Concentração de adsorvato na fase de líquido	(mg.mL ⁻¹)
C_e	Concentração de adsorvato na fase de líquido externa	(mg.mL ⁻¹)
C_i	Concentração de adsorvato na fase de líquido interna	(mg.mL ⁻¹)
$\overline{C_i}$	Concentração média no volume da partícula de adsorvente	(mg.mL ⁻¹)
C_o	Concentração inicial de adsorvato na fase de líquido	(mg.mL ⁻¹)
D_a	Coefficiente de dispersão axial	(cm ² .min ⁻¹)
D_{ef}	Coefficiente de difusão efetivo	(cm ² .min ⁻¹)
E	Distribuição de tempo de residência (DTR) do fluido	(min)
f_d	Fator de diluição da amostra	
h	Altura do leito de adsorvente na coluna	(cm)
k_1	Constante da reação de adsorção	(mL.mg ⁻¹ .min ⁻¹)
k_2	Constante da reação de dessorção	(min ⁻¹)
k_a	Taxa de adsorção	(mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)
k_d	Constante de dissociação	(mg.mL ⁻¹)
k_e	Coefficiente de transferência de massa externo	(cm.min ⁻¹)
k_f	Coefficiente de transferência de massa	(cm.min ⁻¹)
k_i	Coefficiente de transferência de massa interno	(cm.min ⁻¹)

k_L	Coeficiente global de transferência de massa	(cm.min ⁻¹)
K_a	Constante de equilíbrio na adsorção	(mL.g ⁻¹)
K_{wl}	Coeficiente de extinção	(cm ² .μmol ⁻¹),
L	Comprimento do caminho ótico	(cm)
$M_{0,1}$	Primeiro momento ou tempo médio de retenção	(min ⁻¹)
$M_{0,1}^L$	Primeiro momento para o leito	(min)
$M_{0,1}^s$	Primeiro momento para o sistema completo	(min)
$M_{0,1}^v$	Primeiro momento para a coluna sem o leito	(min)
N	Número de pontos internos de colocação ortogonal	
N_u	Número de Nusselt($k_L Z^2 / RD_a$)	adimensional
P_e	Número de Peclet($Z v_s / \varepsilon_e D_a$)	adimensional
q	Concentração de adsorvato na fase de sólido	(mg.mL ⁻¹)
q_i	Concentração de adsorvato por unidade de volume de sólido	(mg.mL ⁻¹)
q_m	Capacidade máxima do adsorvente(fase de sólido)	(mg.mL ⁻¹)
Q	Vazão volumétrica	(mL.min ⁻¹)
r	Variável espacial(radial)	(cm)
\Re	Taxa de transferência de massa na interface	(mg. min ⁻¹ .mL ⁻¹)
R	Raio da partícula do adsorvente	(cm)
t	Tempo	(min)
t_0	Tempo de injeção do traçador	(min)
T_R	Tempo de retenção médio	(min)
u	Variável espacial($u=x^2$)	adimensional
u	Velocidade linear da fase de líquido na coluna($v_s=u\varepsilon_e$)	(cm.min ⁻¹)
U	Unidades de atividade por unidade de volume	(U.mL ⁻¹)
v	Volume da fase de sólido	(mL)
v_s	Velocidade superficial da fase de líquido na coluna	(cm.min ⁻¹)
V	Sinal medido no espectrofotômetro no tempo t	(mV)

V	Volume da fase de líquido	(mL)
V_A	Volume de amostra no ensaio de atividade	(mL)
V_T	Volume total do ensaio de atividade	(mL)
x	Variável espacial(r/R)	adimensional
Y	Variável espacial(z/Z)	adimensional
z	Distância axial ao longo do leito de adsorvente na coluna	(cm)
Z	Comprimento do leito na coluna	(cm)
α	Parâmetro da função peso do polinômio de Jacobi	
β	Parâmetro da função peso do polinômio de Jacobi	
Δt	Intervalo de tempo	(min.)
ε_e	Porosidade do leito de partículas na coluna	adimensional
ε_i	Porosidade da partícula de adsorvente	adimensional
Φ	Concentração(C_e/C_0)	adimensional
Γ	Concentração de adsorvato na fase de sólido	(mg.g ⁻¹)
Γ_i	Concentração de adsorvato por unidade de massa de sólido	(mg.mL ⁻¹)
Γ_m	Capacidade máxima do adsorvente(fase de sólido)	(mg.g ⁻¹)
η	Relação entre volumes(v/V)	adimensional
λ	Comprimento de onda	(nm)
Θ	Concentração(\bar{C}_i/C_0)	adimensional
Θ_b	Concentração(C_b/C_0)	adimensional
Θ_i	Concentração(C_i/C_0)	adimensional
ρ_p	Densidade aparente da partícula de adsorvente	(g.mL ⁻¹)
ρ_s	Densidade global de sólido do adsorvente	(g.mL ⁻¹)
σ^2	Variância	(min ⁻²)
τ	Tempo(tD_a/Z^2)	adimensional
Ψ	Variável auxiliar($1-\varepsilon_e/\varepsilon_e$)	adimensional
τ	Tempo(tD_e/R^2)	adimensional

RESUMO

Nos últimos anos, a utilização das enzimas na indústria vem aumentando rapidamente, mas ainda existe um grande campo para a sua expansão. A β -Galactosidase pode ser utilizada para a preparação de diversos produtos lácteos com baixo teor de lactose, tais como: leite para consumo, iogurtes, sorvetes, queijos, doce-de-leite, entre outros. Este trabalho de pesquisa envolveu a determinação experimental e modelagem matemática das características de transferência de massa para um sistema enzima-adsorvente (β -Galactosidase de *Scopulariopsis sp.* e a resina aniônica Accell Plus QMA), com a análise do fator de concentração e de purificação da enzima e de sua respectiva atividade, quando submetidas às operações de adsorção e eluição em leitos fixos, e uma etapa final de purificação através de filtração em gel. A enzima β -Galactosidase foi produzida através de cultivo em substrato sólido (farelo de trigo e água) utilizando-se o fungo *Scopulariopsis sp.*. Verificou-se que polifenóis presentes no material impediam a adsorção da enzima na resina aniônica. Estudou-se o uso de operações de ultrafiltração, precipitação em acetona, e diálise, e também a combinação dessas operações, para remover polifenóis no preparo de soluções contendo a enzima. Verificou-se que todas essas operações combinadas removem polifenóis, porém não na totalidade. Obteve-se isotermas de adsorção, curvas cinéticas em tanque agitado e curvas de ruptura, tanto de proteína como de atividade da enzima. Os modelos matemáticos aplicados à adsorção em tanque agitado e coluna cromatográfica foram discretizados através do método da colocação ortogonal. Os sistemas de equações diferenciais e algébricas resultantes foram solucionados através da rotina DASSL. Verificou-se que o modelo de Langmuir explica as isotermas de adsorção de proteína, mas somente uma parte daquela de atividade, devido a presença de polifenóis. Um fator de purificação de 3,3 vezes para a enzima foi obtido num dos ensaios de adsorção em coluna. Programas computacionais implementados em Fortran permitiram o cálculo de parâmetros de transferência de massa, com base nos dados experimentais de adsorção em tanque agitado e coluna cromatográfica; o valor desses parâmetros são maiores que aqueles obtidos por outros pesquisadores, quando utilizaram substâncias puras em ensaios com a mesma resina aniônica.

ABSTRACT

In last years, enzyme utilization in industry has been increasing fast, but a large field still remains for it's complete expansion. Beta-Galactosidase may be used for preparations of different milky products containing lower lactose levels. The aim of this work was the experimental determination and mathematical modeling of mass transfer characteristics for an enzyme-adsorbent system (Beta-Galactosidase from *Scopulariopsis sp.* And the anionic resin Accell Plus QMA), including analysis of concentration factor and enzyme activity and purification, when submitted to adsorption operations and fixed-bed elution, and a final step involving purification from gel filtration. The Beta-Galactosidase enzyme was produced from solid substrate cultivation (wheat bran and water) of *Scopulariopsis sp.*. It was verified that the presence of polyphenols into the material impeded enzyme adsorption on the anionic resin. It was studied the use of some operations, such as ultrafiltration, acetone precipitation, dialysis and the combination on them in order to remove the polyphenols during the preparation of the solutions containing the enzyme. It was obtained adsorption isotherms, kinetic curves in stirred tank and breakthrough curves of protein as much as enzyme activity. The mathematical models applied to adsorption in stirred tank and chromatography columns were discretized by the orthogonal collocation method. The resulting algebraic and differential equations system were resolved by the DASSL routine. It was verified that Langmuir model explains the protein adsorption isotherms, but just a part from activity, due to the presence of polyphenols. A purification factor equals to 3.3 for the enzyme was obtained in one of the column adsorption's experiments. Computational programs using Fortran language permitted the mass transfer parameters calculations, from the use of the experimental adsorption values in stirred tank and chromatography column; the parameters values were higher than the obtained from others researchers, when they used pure substances in experiments with the same anionic resin.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 Escopo

Proteínas são compostos macromoleculares, formados pela associação de aminoácidos, cujo peso molecular pode variar de alguns milhares até milhões de Daltons (VOET e VOET, 1995). Dentre os bioprodutos resultantes da indústria biotecnológica destacam-se as proteínas que apresentam propriedades catalíticas (enzimas) e terapêuticas. Essas proteínas podem ser obtidas a partir de diversas fontes, tais como extratos de plantas, de tecidos (órgãos) de animais, além de poderem ser produzidas através de processos de fermentação utilizando-se microorganismos.

Nos últimos anos, a utilização das enzimas na indústria vem aumentando rapidamente, mas ainda existe um grande campo para a sua expansão. Novas enzimas vão criando novas oportunidades e em alguns ramos da indústria a utilização delas está apenas no início. As razões do sucesso das enzimas podem ser resumidas da seguinte forma: são eficientes, precisas, práticas e fazem parte de um meio ambiente sustentável (NOVO NORDISK, 1992).

O maior objetivo das técnicas de recuperação de bioprodutos(“downstream processing”) em biotecnologia tem sido o desenvolvimento das operações unitárias que combinem alta eficiência, mas ao mesmo tempo procurando-se reduzir o número de passos necessários para concentrar e/ou purificar até determinado grau a molécula alvo. A adsorção de enzimas está dentro desta categoria(BELTER et al.,1988; PAPAMICHAEL e HUSTEDT, 1995).

As necessidades recentes de isolamento e recuperação em grande escala tem trazido inovações importantes nas operações unitárias necessárias para os esquemas de tratamento e de purificação das proteínas. Em sua revisão sobre as alternativas de redução de etapas de concentração e de purificação de proteínas, CHASE(1994) indica que a adsorção em leitos expandidos e fluidizados de resinas mostra-se tecnicamente viável e com grande potencial na substituição de seqüências usuais de operações como é o caso da filtração, da centrifugação, ou de ambas, seguida da adsorção em leito fixo.

A purificação de enzimas através da adsorção e posterior eluição em resinas trocadoras de íons é um método bem difundido na literatura. Esse processo tem sido utilizado em escalas de laboratório e industrial para a viabilização da recuperação de biomoléculas em geral, permitindo a obtenção de produtos com diversos graus de pureza.

Na indústria de produtos da biotecnologia a cromatografia de troca iônica é uma das técnicas mais utilizadas para a concentração e purificação de proteínas. Estima-se que ela é utilizada em cerca de 75% dos esquemas preparativos. As razões para tal sucesso, e ampla aplicação, são o elevado poder de resolução, a elevada capacidade, e o custo relativamente baixo(CHANG e CHASE,1996).

Na literatura científica a grande maioria dos resultados publicados se baseia na análise experimental de sistemas onde as enzimas puras são dissolvidas em solução-tampão de modo a assegurar a existência de apenas uma espécie química que seja adsorvida, evitando-se desta forma a competição com outras espécies químicas.

A β -Galactosidase (E.C. 3.2.1.23) é uma das enzimas mais estudada, e relatada na literatura científica. A maioria dos trabalhos está relacionada com a enzima produzida pela *Escherichia coli*. Entretanto, esta enzima está amplamente distribuída na natureza, e pode ser encontrada em plantas, órgãos de animais, leveduras, fungos e bactérias (RICHMOND e STINE, 1981).

A β -Galactosidase catalisa a hidrólise do β -D-Galactosídeo e também do α -L-Arabinosídeo (WHITAKER, 1972). Esta enzima também é capaz de catalisar a síntese de certos oligossacarídeos via reação de transferência do galactosil.

A β -Galactosidase pode ser utilizada para a preparação de diversos produtos lácteos com baixo teor de lactose, tais como: leite para consumo, iogurtes, sorvetes, queijos, doce-de-leite, entre outros. Pesquisas médicas já mostraram que baixos teores de β -Galactosidase intestinal, ou baixa tolerância à lactose, são comuns a muitos indivíduos, principalmente após a primeira infância, fato que restringe a aceitabilidade do leite e dos derivados contendo lactose.

O aproveitamento do soro ácido de leite como adoçante, um subproduto da indústria queijeira, e que contém, além da lactose, proteínas, ácido láctico, e sais nutrientes que são, na maioria das vezes, desperdiçados, pode ser feito com a aplicação da β -Galactosidase para a hidrólise da lactose em glicose e galactose (RICHMOND e STINE, 1981).

A cristalização da lactose em produtos lácteos tais como sorvetes e doce-de-leite, pode ser evitada através da hidrólise da lactose da matéria prima, utilizando-se a enzima β -Galactosidase.

PASTORE e PARK (1980), conseguiram selecionar, partindo de amostras de solo, uma linhagem de *Scopulariopsis sp.*, que é capaz de produzir elevadas quantidades

de uma β -Galactosidase. Realizaram, a partir de um extrato bruto, um trabalho de purificação em coluna de DEAE-celulose.

No presente projeto de pesquisa propõe-se a utilização de leitos de resina trocadora de íons aniônica para a concentração e purificação da enzima β -Galactosidase(β -D-Galactosídeo Galactohidrolase, EC 3.2.1.23) produzida pelo fungo *Scopulariopsis sp.* selecionada por PASTORE e PARK(1980), e PASTORE(1982).

1.2. Objetivos

Este trabalho de pesquisa envolveu a determinação experimental e modelagem matemática das características de transferência de massa para um sistema enzima-adsorvente (β -Galactosidase de *Scopulariopsis sp.* e a resina de troca iônica aniônica denominada Accell® Plus QMA), com a análise do fator de concentração e de purificação da enzima e de sua respectiva atividade, quando submetidas às operações de adsorção e eluição em leitos fixos, e uma etapa final de purificação através de filtração em gel.

Especificamente foram estudados os seguintes aspectos:

1. Determinação da porosidade das partículas do adsorvente(resina trocadora de íons aniônica Accell® Plus QMA), e do leito das mesmas em coluna cromatográfica, utilizando-se a técnica dos momentos;
2. Obtenção de isotermas de adsorção de proteína total e de β -Galactosidase(medida através de sua atividade), sobre o adsorvente Accell® Plus QMA;
- 3 - Obtenção, num aparato que simula um tanque agitado, curvas cinéticas de adsorção de proteína total e de β -Galactosidase(medida através de sua atividade), sobre o adsorvente Accell® Plus QMA;

4 - Determinação da capacidade de adsorção do leito de partículas em coluna cromatográfica, através da obtenção de curvas de concentração na saída do leito em função do tempo e/ou volume de solução injetada - curva de ruptura("breakthrough"), para leitos fixos;

5 - Estudo da eluição da β -Galactosidase adsorvida em Accell[®] Plus QMA em colunas cromatográficas, para a verificação da reversibilidade da adsorção, e cálculo do rendimento do processo e do fator de purificação da enzima;

6 - Estudar a purificação da enzima eluída na cromatografia de troca iônica, utilizando-se filtração em gel;

7 - Modelagem da cinética de adsorção em tanque agitado, para a determinação dos coeficiente de transferência de massa no filme e do coeficiente de difusão nos poros do adsorvente(Accell[®] Plus QMA);

8 - Modelagem da adsorção da enzima em leito fixo de partículas do adsorvente, para a determinação do coeficiente de dispersão axial e do coeficiente global de transferência de massa da fase líquida para a fase sólida;

CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enzimas

Enzimas são biocatalisadores orgânicos que governam, dão início e controlam importantes reações biológicas para os processos de vida. Elas são produzidas pelas células vivas, mas podem agir independentemente da célula se forem criadas condições apropriadas no ambiente. Todas as enzimas conhecidas são proteínas e algumas delas contêm grupos não-protéicos denominados de grupos prostéticos que são essenciais para a manifestação da atividade catalítica. Enzimas são, por conseguinte, macromoléculas coloidais termolábeis, que exibem elevado grau estereoquímico e especificidade pelo substrato. A importância das enzimas em sustentar e promover o crescimento e o desenvolvimento celular é um fato reconhecido. O uso de enzimas para o processamento e a preservação de alimentos antecede a civilização moderna (KILARA e SHAHANI, 1985).

2.1.1. β -Galactosidase

A enzima β -Galactosidase (β -D-Galactosídeo Galactohidrolase, EC 3.2.1.23), freqüentemente denominada de **lactase**, um nome obsoleto, tem sido uma das enzimas mais cuidadosamente estudadas, visto que ela é facilmente induzida em microrganismos (RICHMOND e STINE, 1981). Esta enzima catalisa a hidrólise do β -D-Galactosídeo e também do α -Arabinosídeo (WHITAKER, 1972). Entre os substratos naturais desta enzima, a ação sobre a lactose do leite tem sido a mais estudada.

A β -Galactosidase é de interesse para a ciência e tecnologia de alimentos por diversas razões. A hidrólise da lactose produz glicose e galactose. A lactose tem uma solubilidade limitada, e tende a precipitar-se em produtos lácteos congelados, e também no doce-de-leite, conferindo a estes produtos uma estrutura arenosa. A hidrólise de parte da lactose presente permite a solução do problema. Uma parcela significativa da população mundial tem intolerância ao leite, visto que não possuem β -Galactosidase no intestino. Portanto, não podem metabolizar a lactose.

2.1.2 Fontes da Enzima β -Galactosidase

A β -Galactosidase é uma das enzimas mais estudada na literatura. Porém, uma parte significativa dos trabalhos são referentes à enzima produzida pela *Escherichia coli*. Entretanto, esta enzima está amplamente distribuída na natureza, e pode ser encontrada em plantas, órgãos de animais, leveduras, fungos, bactérias e actinomicetes (Tabela 2.1). As β -Galactosidasess dessas diferentes fontes variam de forma considerável em muitas das suas propriedades, embora a especificidade da enzima permaneça, essencialmente, a mesma, conforme a Figura 2.1, como proposto em WHITAKER (1972) e RICHMOND e STINE (1981). O peso molecular da molécula e das subunidades,

temperatura e pH ótimos para a atividade são variáveis de uma β -Galactosidase para outra.

Tabela 2.1 - Algumas Fontes de β -Galactosidase.

Plantas

Pêssego
Damasco
Amêndoa
Kefir
Ponteira de rosa selvagem
Sementes de alfafa
Bagas de café

Órgãos de Animais

Intestino
Cérebro
Tecido da pele
Testículo
Placenta

Leveduras

Kluveromyces(Sacharomyces) lactis
Kluveromyces(Sacharomyces) fragilis
Kluveromyces pseudotropicalis

Bactérias

Escherichia coli
Bacillus megaterium
Thermus equaticus
Streptococcus lactis
Streptococcus thermophilus
Lactobacillus bulgaricus
Lactobacillus helareticus

Fungos

Neurospora crousa
Aspegillus foetidus
Aspegillus niger
Aspegillus flavus
Aspegillus oryzae
Aspegillus phoenicis
Mucor meihei

Fonte: RICHMOND e STINE(1981).

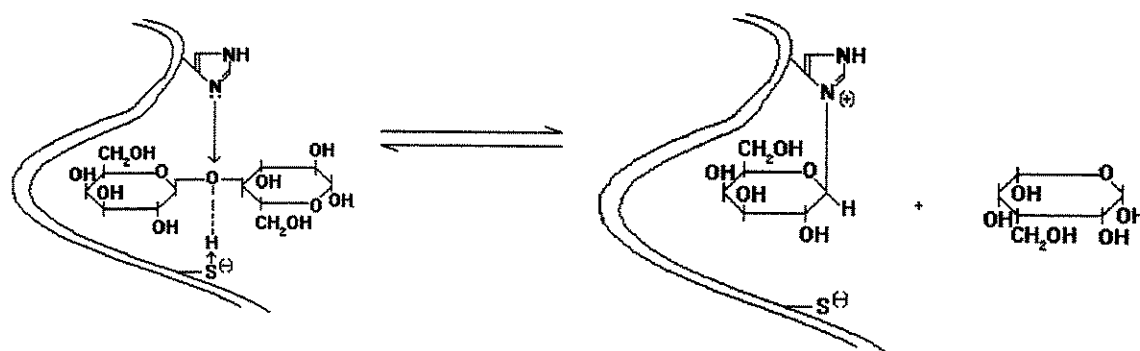


Figura 2.1 - Sítio ativo da enzima e mecanismo de hidrólise da lactose.

2.2. Produção de Enzimas por Cultivo em Substrato Sólido.

Enzimas microbianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa em meio líquido como por cultivo(fermentação) em substrato sólido(RAMAMURTHY e KOTHARI, 1993). Processos de cultivo em substrato sólido já foram desenvolvidos para a produção de enzimas fúngicas (pectinases, amilases, proteases, amiloglucosidases, etc)em escala industrial(LONSANE e GHILDYAL, 1992). Dentre as vantagens deste método incluem-se a simplicidade, o baixo custo de produção, a elevada produção de enzimas e a baixa quantidade de resíduos industriais(MITCHELL e LONSANE, 1992). Além disso, o cultivo em substrato sólido previne o fenômeno da repressão catabólica que influencia adversamente a biossíntese de alguns produtos microbianos(MITCHELL et al., 1992).

O cultivo em substrato sólido é um método conveniente para a produção de algumas enzimas industriais. Devido a este fato, houve um renovado interesse por este método nos últimos anos(LONSANE e GHILDYAL, 1992). Entretanto, poucas informações estão disponíveis com respeito aos processos de recuperação, concentração e de purificação de enzimas produzidas por meio de cultivo em substrato sólido, apesar da importância deste método já estar difundida.

Os métodos de purificação desenvolvidos para proteínas produzidas através de fermentação submersa em líquido não podem, frequentemente, serem aplicados diretamente para substâncias produzidas por meio de cultivo em substrato sólido. Neste último sistema de produção o primeiro passo é a lixiviação da substância produzida, a qual está contida no substrato sólido fermentado, para obter-se um extrato bruto. O envolvimento de uma massa sólida ao processo, além da baixa concentração da substância produzida pelo microorganismo, geram problemas que são gerais (LONSANE e KRIAHNAIAH, 1992).

2.3. Estratégia para a Concentração e Purificação de Proteínas

A meta de uma estratégia de purificação de uma proteína é a de obtenção do máximo de rendimento de proteína de alta pureza, além de custos compatíveis com os do mercado. Dessa forma, para realizar esta tarefa deve-se fazer a escolha apropriada dos passos da estratégia, e ordena-los para minimizar o número deles

Cada proteína possui uma combinação única de propriedades, as quais serão exploradas nos passos da estratégia de purificação. Na Tabela 2.2 apresenta-se uma síntese das propriedades exploradas pelas técnicas. Partindo-se de uma mistura de proteínas que contém aquela que se deseja purificar, cada passo da estratégia irá explorar uma dessas propriedades (HARRIS, 1975).

Cada técnica empregada deverá ser avaliada em relação à sua capacidade, poder de resolução, seletividade, rendimento provável de proteína, e custos. A capacidade da técnica está relacionada com a quantidade de amostra, em volume ou em concentração de proteína que pode ser manuseada. Um requisito chave no início do processo de purificação é o da redução do volume onde se encontra a proteína que deseja-se purificar. Técnicas de alta capacidade, tal como a precipitação, são empregadas no início do processo (ROE, 1995).

Naturalmente, os processos cromatográficos por troca iônica são de alta capacidade, e são utilizados nos passos iniciais do processo de purificação. A permeação em gel tem baixa capacidade; portanto não será utilizada, na maioria das vezes, nos estágios iniciais do processo de purificação(HARRIS, 1995).

Seletividade é a medida da habilidade da técnica de purificação em separar a proteína de interesse com uma alta rejeição de contaminantes. Métodos com alta seletividade são reservados, normalmente, para os estágios finais do processo de purificação, visto que eles são mais hábeis em separar proteínas similares remanescentes dos estágios iniciais do processo(WHEELWRIGHT, 1991). Exemplos de técnicas de alta seletividade incluem a cromatografia por afinidade, e cromatografia metal-quelato

A resolução é determinada pela eficiência com a qual a técnica separa proteínas uma das outras. É o alvo de cada uma das etapas da purificação. A precipitação tem baixa resolução, enquanto as técnicas de cromatografia possuem resolução maiores, desde que o grau de separação seja melhorado pelas múltiplas oportunidades de reequilíbrio à medida que o fronte desloca-se através da coluna. O uso de técnicas com alta resolução minimiza o número de passos necessários, e são mais e mais importantes à medida que o grau de pureza é aumentado(HARRIS, 1995).

Devido à natureza das interações e de condições utilizadas, as técnicas exibirão uma faixa de rendimento médio. A precipitação com sulfato de amônio e a extração em sistemas de duas fases aquosas apresentam, normalmente, rendimentos superiores a 80%. Técnicas por afinidade resultam em baixos rendimentos (em torno de 60%) devido às condições drásticas que são normalmente empregadas para a eluição.

Técnicas que envolvem afinidade são, na maioria das vezes, mais caras, e por isso elas não são de uso freqüente nos passos iniciais do processo de purificação. Uma técnica barata é usualmente empregada primeiro, para a remoção de contaminantes tais como lipídeos, DNA, partículas grosseiras de matéria orgânica, etc., evitando-se, dessa forma,

danos às colunas por afinidade que tem custo elevado. A remoção de proteases, quando utiliza-se um peptídeo como ligante na coluna de afinidade, é uma medida recomendada para a preservação da coluna.

2.3.1. Ordenação das Técnicas

A análise de diversas estratégias de purificação indicam que a homogeneização é a primeira etapa utilizada na maioria das estratégias de purificação. Geralmente, o restante da sequência de passos da estratégia inclui a precipitação, seguida de cromatografia por troca iônica, cromatografia por afinidade e finalmente a permeação em gel. Esta sequência para a estratégia tem uma lógica única. Cada técnica cromatográfica explora uma propriedade diferente da outra.

Emprega-se primeiramente a precipitação, visto que esta técnica pode manusear uma quantidade maior de material em volume, além de concentrar a proteína. Cromatografia por troca de íons poderá ser utilizada, na sequência, com o objetivo de remover a maioria dos contaminantes, antes do uso de uma técnica de custo mais elevado: a cromatografia por afinidade. A permeação em gel é, então, utilizada como etapa final, quando a capacidade já não é mais um problema. Não é possível estabelecer uma estratégia universal para todas as proteínas. Os materiais disponíveis e os requisitos para cada aplicação são diferentes(HARRIS, 1995).

A análise do material por eletroforese em gel indicará o quanto está pura a proteína, e quantos contaminantes estão presentes. Além disso, se o método SDS-PAGE for utilizado, o peso molecular dos contaminantes poderá ser determinado, e indicará também se a cromatografia por permeação em gel está removendo os contaminantes.

2.4. Aspectos Gerais dos Processos Cromatográficos

Um leito constituído de partículas de resina sólida(coluna cromatográfica), percolado por um líquido contendo proteínas, é a principal forma de contato para a obtenção da recuperação e da separação desses compostos. A fase sólida é denominada de fase estacionária, enquanto a fase que contém a mistura a separar é atribuído o termo fase móvel.

O princípio de separação de uma mistura consiste na existência de interação entre os constituintes da mistura e a fase estacionária, fazendo com que cada uma das espécies a ser separada seja transportada com velocidade diferente. Consequentemente, tem-se a separação dos constituintes da mistura. Essa técnica é reconhecida como cromatografia verdadeira ("true chromatography")(NICOUD e PERRUT, 1991).

Por outro lado, a interação reversível de um componente com a matriz, sob determinadas condições, possibilita a concentração desse componente, quando é realizada a eluição por meio de alterações do meio, tais como força iônica e pH.

Essa última técnica é um típico processo de adsorção, que é também denominado de cromatografia pelo fato de ser realizado, geralmente, em leito fixo numa coluna cromatográfica.

Os métodos usados para a operação de colunas empacotadas com trocador de íons são determinadas pelo objetivo da separação. O principal objetivo da cromatografia analítica é de encontrar-se elevada resolução de picos durante a eluição. Amostras diluídas são aplicadas em pequenos volumes, comparados ao volume da coluna, para minimizar interações entre cada componente, de tal forma que a separação seja realizada somente pela própria afinidade pelo adsorvente da coluna. Por outro lado, o foco da separação em escala comercial não é somente a resolução, mas também a economia global

do processo. O método básico para incrementar a produtividade é a de maximizar o uso da coluna, aumentando-se o volume da amostra(JAMES, 1994).

Na cromatografia preparativa, o processo de injeção de amostra na coluna é denominado de adsorção frontal. Mais e mais proteína é injetada na coluna, de tal forma que uma frente de concentração percorre a coluna. Quando a frente atinge o topo da coluna diz-se que ocorreu o rompimento("breakthrough") na saída. Uma consequência deste tipo de operação, que resulta numa carga elevada de proteína no adsorvente, é que a adsorção de cada uma das espécies de proteínas presentes não é independente da outra. Assim que o trocador de íons torna-se saturado, ocorre a competição pelos sítios de adsorção entre as diferentes espécies presentes. Isto conduz a um comportamento não-linear para a adsorção. Além disso, a distribuição de cada espécie de proteína ao longo da coluna é variável devido ao efeito de deslocamento(JAMES, 1994).

Uma curva de ruptura("breakthrough") expressa a concentração de proteína total, ou de cada uma de uma mistura multicomponente, ou ainda de atividade enzimática, no efluente que sai no topo da coluna, *versus* o volume injetado. Alternativamente pode-se utilizar o tempo, quando a vazão volumétrica é constante, ou ainda a quantidade de proteína ou de atividade injetada por unidade de massa do adsorvente presente na coluna cromatográfica.

Freqüentemente, quando faz-se curvas de ruptura para soluções multicomponentes, observa-se no efluente uma concentração maior que aquela de injeção para um ou mais componentes da mistura. Este fenômeno é denominado de "roll-up", e já foi observado por diversos autores durante a adsorção em cromatografia frontal, tanto para soluções multicomponentes de proteínas como de outras substâncias (JAMES, 1994; KAPOOR e YANG, 1997; LIAPIS e RIPPEN, 1978; RHE e ADMUNDSON, 1974; SANTACESARIA et al., 1982; SKIDMORE e CHASE, 1990).

Tabela 2.2 - Propriedades das Técnicas Comumente Utilizadas em Purificação.

Técnica	Propriedade Explorada	Capacidade	Resolução	Rendimento	Custo	Composição Da Amostra	Composição do Produto
Precipitação por alteração do pH	Carga	Alta	Muito Baixa	Médio	Baixo	$> 1 \text{ mg.mL}^{-1}$	Volume pequeno, Alta concentração
Precipitação $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Hidrofobicidade	Alta	Muito Baixa	Alto	Baixo	$> 1 \text{ mg.mL}^{-1}$	Alto, Volume pequeno, Alta concentração
Duas Fases Aquosas, Extração	Mistura Bioafinidade	Alta Alta	Muito Baixa Alta	Alto Variável	Baixo Alto	Pode conter sólidos	Polímero de Alta concentração, ex. PEG
Cromatografia por Troca Iônica	Carga	Média	Média	Médio	Médio	Baixa pH correto	Alta pH diferente
Cromatografia por Interação Hidrófoba	Hidrofobicidade	Média	Média	Médio	Médio	Alta	Baixa pH diferente
Focalização Isoelétrica	Carga/pI	Baixa	Alta	Médio	Alto	Baixa	Presença de anfólitos
Cromatografia por Afinidade (Corante)	Mistura	Média	Alta	Médio	Médio	Baixa pH Neutro	Alta pH diferente
Cromatografia por Afinidade (Ligante)	Bioatividade	Média-baixa	Muito Alta	Baixo	Alto	Depende do Ligante	Condições potencialmente desnaturante
Cromatografia por Filtração em Gel	Tamanho	Muito baixa	Baixa	Alto	Médio	Volume Baixo	Diluído

Fonte: HARRIS e ANGAL(1995).

O fenômeno "roll-up" pode ser explicado utilizando-se o princípio de equilíbrio multicomponente e difusão. Inicialmente, uma frente de componentes de interação mais fraca, numa concentração maior que a de alimentação, percorre a coluna mais rapidamente que a frente de componentes de interação mais forte. Dessa forma os componentes de interação mais fraca saem no efluente numa concentração maior que aquela de alimentação. Uma descrição detalhada do fenômeno, para a adsorção binária de lactoferrina e de lactoperoxidase em SP-Sepharose High Performance, pode se encontrada em JAMES(1994).

2.4.1. A Matriz do Trocador de Íons

Um trocador iônico consiste de uma matriz insolúvel à qual grupos carregados estão covalentemente ligados. Esses grupos carregados estão associados com contra-íons móveis. Os contra-íons podem ser reversivelmente trocados por outros íons de mesma carga sem alterações na matriz. É possível ter-se trocadores carregados positivamente, bem como carregados negativamente(PHARMACIA BIOTECH, 1996).

Trocadores carregados positivamente possuem contra-íons de carga negativa(ânions) disponíveis para troca, e por isso são denominados de trocadores aniônicos. Por outro lado, trocadores carregados negativamente possuem contra-íons de carga positiva(cátions) disponíveis para troca, e por isso são denominados de catiônicos.

A matriz do trocador de íons pode estar baseada em compostos inorgânicos, resinas sintéticas, ou ainda em polissacarídeos. As características da matriz determinam as propriedades cromatográficas da mesma, podendo-se citar a estabilidade química, a resistência mecânica, a eficiência, bem como a capacidade e recuperação. A natureza da matriz também afetará seu comportamento em relação à outras substâncias químicas e a manutenção de atividade biológica.

A presença de grupos carregados é uma propriedade fundamental dos trocadores de íons. O tipo de grupo determinará o tipo e força do trocador de íons; o número de grupos determinará a capacidade. Há uma variedade de grupos que podem ser escolhidos para uso em trocadores de íons; alguns grupos estão relacionados na Tabela 2.3 abaixo.

Grupos sulfônico e amino-quaternário são utilizados para formarem trocadores de íons denominados de *fortes*; os outros grupos formam os trocadores denominados de *fracos*. Os termos *forte* e *fraco* referem-se à extensão da variação da ionização com o pH, e não com a força da ligação. Os trocadores de íons *fortes* estão completamente ionizados numa ampla faixa de pH, ao passo que os trocadores *fracos* o grau de dissociação e a capacidade de troca variam muito mais com o pH.

A resina trocadora de íons aniônica denominada **Accell® Plus QMA**, fornecida pela Waters Chromatography Divison Millipore, tem uma matriz de sílica com um copolímero de acrilamida, e o grupo funcional é um amino quaternário. De acordo com a planilha de informações químicas, fornecida pela Waters, as partículas do trocador são rígidas, de formato irregular, com tamanho das partículas variando de 32 a 55 μm (média de 46 μm), e o tamanho médio dos poros igual a 300 Å. ARAÚJO(1996) determinou a densidade aparente desta resina, e obteve o valor de 1,16 g.mL^{-1} .

Tabela 2.3 - Grupos funcionais utilizados em trocadores de íons.

Trocadores Aniônicos	Grupo Funcional
Dietilaminoetil (DEAE)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
Aminoetil Quaternário (QAE)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2\text{CHOH}-\text{CH}_3$
Amônio Quaternário (Q)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Trocadores Catiónicos	Grupo Funcional
Carboximetil (CM)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
Sulfopropil (SP)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
Metil Sulfonato (S)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

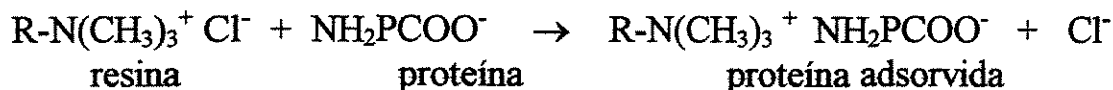
Fonte: PHARMACIA BIOTECH, 1996.

2.4.2. Adsorção de Proteínas em Resinas Trocadoras de Íons

Adsorventes trocadores de íons, desde a sua introdução em 1956, são amplamente usados na purificação de proteínas tanto em escala industrial como em escala laboratorial. Um estudo realizado mostrou que 75% dos protocolos de purificação de proteínas publicados utilizaram algum tipo de adsorvente trocador de íons. Esses adsorventes são versáteis, relativamente baratos, e são aceitos pelas autoridades reguladoras de produtos da área farmacêutica (SKIDMORE et al., 1990).

Trocadores de íons com estrutura macroporosa são usados em diversas aplicações comerciais devido a sua elevada capacidade para proteínas. O processo de adsorção envolve o transporte da proteína desde a fase de líquido que a mantém em solução até os sítios no interior da partícula de resina. A taxa global de captura das proteínas é determinada pelo equilíbrio e efeitos de transferência de massa, incluindo-se a difusão nos poros do adsorvente e difusão no filme de líquido que envolve a partícula de resina. Em sistemas multicomponentes, a dinâmica da adsorção é adicionalmente complicada pela diferença de taxas de difusão e equilíbrio competitivo (JAMES, 1994).

As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por interações do tipo eletrostáticas que se formam entre as cargas da superfície da proteína e os grupos carregados do adsorvente. As cargas da resina são balanceadas por contra-íons tais como cloreto, íons metálicos ou mesmo íons presentes na solução tampão. A molécula da proteína desloca os contra-íons que situam-se nos poros da resina e fica adsorvida na matriz sólida. Como resultado global, a região do adsorvente se torna eletricamente neutra, e o saldo de carga da proteína será do mesmo sinal daquelas dos contra íons deslocados, resultando o nome de troca de íons para o mecanismo de adsorção. Como exemplo, tomemos um caso de troca de ânions onde uma proteína carregada negativamente é adsorvida numa resina que possui o grupamento amino quaternário e íons cloreto:



Esta etapa também é denominada de fixação da proteína. A dessorção, ou eluição, da proteína é obtida numa etapa subsequente através da modificação do pH para um valor inferior ao pI da proteína, com a adição, por exemplo, de um ácido como o HCl, ou ainda o próprio tampão com adição de NaCl:



Um exemplo típico de sistema de adsorção que utiliza esse princípio está reportado em CARRÈRE(1993), utilizando-se a resina Spherosil QMA para concentrar as proteínas lactalbumina e lactoglobulina presentes no soro de queijo. O ácido clorídrico numa concentração 0,1 N foi utilizado, neste caso, para a eluição. Um esquema do processo descrito está representado na Figura 2.2.

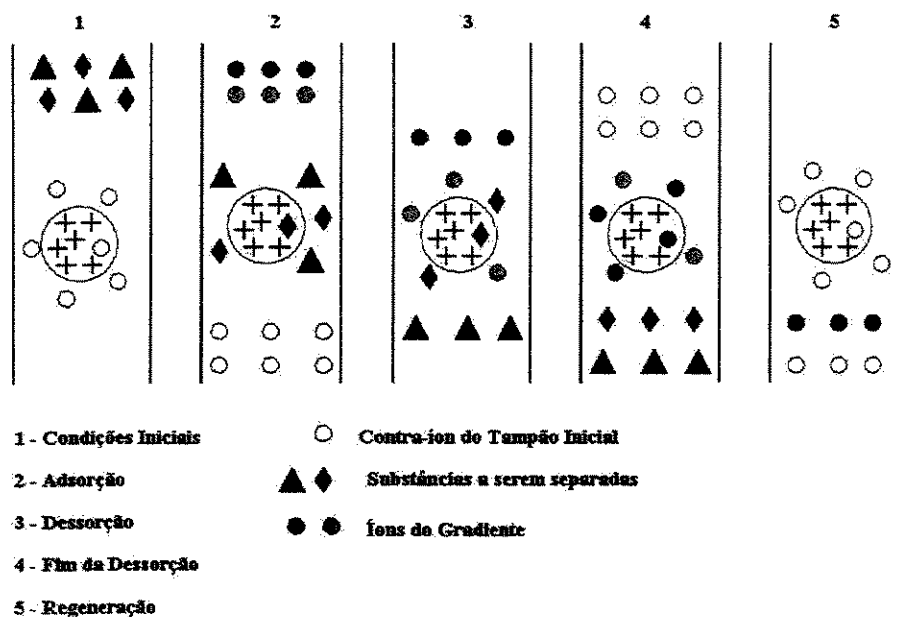


Figura 2.2 - Esquema do processo de separação de substâncias por troca iônica(PHARMACIA BIOTECH, 1996)

2.4.3. Tampões Usados em Troca Iônica

A fase móvel utilizada em cromatografia por troca de íons é, normalmente, a aquosa, visto que as propriedades eletrolíticas da água contribuem para a dissociação dos grupos ionizáveis e inchaço da matriz(SCOPES,1987); ambos aumentam a taxa de troca de íons. Numa solução aquosa os grupos superficiais de uma proteína estão associados com contra-íons numa forma similar àquela dos grupos ionizáveis do trocador de íons.

Os tampões mais comumente utilizados em troca iônica de proteínas estão listados na Tabela 2.4 abaixo. O tampão mais apropriado para um processo de purificação dependerá da escolha do trocador iônico e do pH de adsorção(ROE, 1995).

Tabela 2.4 - Tampões comumente utilizados em troca iônica

Trocador de Íons	Tampão	pK	Faixa Tamponante
Catiônico	Acético	4.76	4.8-5.2
	Cítrico	4.76	4.2-5.2
	MES	6.15	5.5-6.7
	Fosfato	7.20	6.7-7.6
	HEPES	7.55	7.6-8.2
Aniônico	L-Histidina	6.15	5.5-6.0
	Imidazole	7.00	6.6-7.1
	Triethanolamine	7.77	7.3-7.7
	Tris	8.16	7.5-8.0
	Diethanolamine	8.80	8.4-8.8

Fonte: ROE(1995).

A fase móvel na cromatografia por troca iônica deve estar sempre tamponada para evitar flutuações de pH, o que também afetaria a carga da proteína e o equilíbrio entre as fases estacionária e móvel. Um mínimo de 10 mM de força tamponante é recomendada para troca iônica, com 0,5 unidades de pH do valor do pK(SCOPES,

1987). A escolha da força do tampão é sempre um compromisso entre a minimização da flutuação de pH e a maximização da capacidade do adsorvente.

A carga do tampão não deve interferir no processo de troca de íons; isto é, deve-se utilizar tampões carregados negativamente, tal como acetato, com trocador catiônico. A temperatura afeta o valor do pK_a do tampão, e isto causa variação na capacidade tamponante do mesmo.

2.4.4. Seleção do pH e da Força Iônica para Adsorção e Eluição

O grau de interação iônica entre a proteína e o trocador poderá ser controlada através do ajuste do pH do tampão, para regular o grau de ionização tanto dos grupos ionizáveis da matriz como daqueles da proteína. Portanto, o pH deve ser ajustado de forma que favoreça a adsorção da proteína no trocador iônico, ou que favoreça a dissociação proteína-matriz para a eluição da mesma.

A força iônica do tampão utilizado em cromatografia por troca de íons controla o grau de bloqueio dos grupos ionizáveis tanto da proteína como da fase estacionária. A força iônica é, portanto, fator que pode controlar o equilíbrio da distribuição da proteína entre as fases móvel e estacionária. Na etapa de adsorção, é utilizada aquela força iônica mais alta que permite a ligação da proteína, enquanto na eluição a força iônica mais baixa é recomendada (HARRIS e ANGAL, 1995).

2.4.5. Adsorção e Eluição em Leitos de Resinas

Em diversas situações de recuperação de proteínas por adsorção o extrato bruto inicial na forma de líquido contém, além de biomoléculas, material orgânico particulado. Necessita-se, neste caso, de uma etapa de filtração e ou centrifugação antes da adsorção em leito fixo de partículas adsorvedoras.

A utilização de leitos fluidizados é vantajosa nessa situação, visto que a utilização de um sistema de porosidade global mais elevada permite a eliminação de operações preliminares de remoção de partículas. Essa concepção tem sido explorada especialmente por fabricantes de resinas adsorventes, como são os casos da Pharmacia® e da Waters®. Estes fabricantes tem procurado fabricar resinas mais densas, portanto mais apropriadas à operação em leitos fluidizados.

Há na literatura um número de sistemas biológicos para os quais foi aplicada recentemente, e com sucesso, a técnica de concentração e purificação de proteínas com o uso de resinas como fase estacionária no caso especial em que o leito é fluidizado (CARRÈRE, 1993; CHASE, 1994; DRAEGER e CHASE, 1990; FIROUZTALE, et al., 1994; FIROUZTALE et al., 1992; FREJ et al., 1994; HANSSON et al., 1994; HORSTMANN e CHASE, 1989; PAPAMICHAEL e HUSTEDT, 1993). Esse sistema de adsorção é especialmente vantajoso em situações em que o líquido que contém a proteína alvo incorpora também impurezas na forma de material particulado; é o caso de separações em biotecnologia aplicada à produção de biomoléculas.

A utilização de leitos fluidizados do tipo sólido-líquido se adapta bem a essa aplicação, visto que a porosidade global elevada evita que o material particulado contaminante provoque a colmatagem (entupimento do meio poroso). Dessa forma, tem-se uma economia de uma operação de separação de particulados, tais como a filtração e a centrifugação.

Estudos pioneiros de adsorção em leitos expandidos foram realizados por DRAEGER e CHASE (1990), e por HORSTMANN e CHASE (1989) utilizando as proteínas BSA (albumina do soro bovino) e imunoglobulina G, respectivamente, como modelo. Os adsorventes utilizados por esses autores em seus trabalhos possuem grupos amino-quaternário. Esses estudos conduziram a um entendimento mais profundo dos efeitos de transferência de massa no processo de adsorção, tal como a difusão internas nos poros e resistência externa à transferência de massa (filme). Os trabalhos de FIROUZTALE et

al.(1992), e FIROUZTALE et al.(1994), com a insulina e cefalosporina C, respectivamente, são também importantes marcos na compreensão do fenômeno da adsorção de proteínas em resinas sólidas.

Trabalhos publicados por HANSSON et al.(1994), e por FREJ et al.(1994), evidenciaram o uso da técnica de leito fluidizado nas escalas de laboratório e piloto para a recuperação de proteínas recombinantes, com a esperada redução no número de etapas necessárias à concentração dos produtos em questão - proteína de fusão ZZ-M5 e annexina V, produzidas pela *Escherichia coli*, respectivamente.

2.4.6. Cromatografia por Exclusão ou Filtração em Gel

A cromatografia por exclusão promove uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, e dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado. Entre outros usos, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros como, por exemplo, proteínas, tendo densidade e forma semelhantes, pode fornecer um método rápido e útil de determinar a massa molecular e a forma destas macromoléculas(COLLINS et al., 1990).

Na cromatografia por exclusão de tamanho ou filtração em gel, ou ainda cromatografia por peneira molecular, as moléculas são separadas de acordo com o tamanho e a forma. A massa molecular da menor molécula incapaz penetrar nos poros de um dado gel é denominado de limite de exclusão do gel(VOET e VOET, 1995).

2.5. Eletroforese

Eletroforese, a migração de íons num campo elétrico, é amplamente utilizada para a separação analítica de moléculas biológicas(VOET e VOET, 1995). As proteínas possuem carga líquida positiva em pH abaixo do seu ponto isoelétrico, e

negativa para pH acima desse ponto. As proteínas migram num campo elétrico de maneira dependente de sua carga e densidade dessas cargas. Se uma amostra de uma mistura de proteínas está inicialmente presente numa banda estreita, aquelas que tiverem mobilidade diferentes irão atravessar o campo como zonas discretas, e dessa forma serão separadas durante a eletroforese. Para que haja uma separação mais efetiva utiliza-se um meio que contenha um suporte sólido, o qual irá agir contra os efeitos de difusão e de convecção. O gel de poliacrilamida para eletroforese (PAGE) é o suporte mais utilizado, pois permite alta resolução. Um procedimento particularmente importante em PAGE é a realização do procedimento de eletroforese com um detergente aniônico, tal como o dodecil sulfato de sódio (SDS), para que se tenha condições de caracterizar a proteína em relação ao peso molecular das subunidades constituintes (polipeptídeos) que compõem a estrutura quaternária da mesma (DUNN, 1995).

2.6. Purificação de β -Galactosidase

Fez-se uma pesquisa bibliográfica nas Bases de Dados em CD-ROM, existentes na Biblioteca da Área de Engenharia da UNICAMP. Selecionou-se, entre os artigos encontrados, mais de 60 artigos publicados, nos últimos anos, sobre purificação de β -Galactosidase de diversas fontes. Encontrou-se diversos artigos de pesquisa em que utilizou-se trocadores de íons para a concentração e purificação de β -Galactosidase de diversas fontes. Porém, somente em um destes foi utilizado leito expandido (ARTOLOZAGA et al., 1998) no processo de concentração e purificação. A seguir é apresentada uma revisão de alguns dos artigos selecionados.

PASTORE e PARK (1980), PASTORE (1982) isolaram, a partir de amostras do solo, uma linhagem do fungo *Scopulariopsis sp.*, o qual produz elevada quantidade de β -Galactosidase extra celular. Produziram, por fermentação em meio semi-sólido (farelo de trigo e água), um extrato bruto contendo a enzima. A estratégia de purificação da enzima incluiu a precipitação com sulfato de amônio, diálise, e cromatografia em colunas

de DEAE-celulose e CM-celulose. A enzima purificada era eletroforicamente homogênea, e o peso molecular dela foi estimado em 95 kDa, tanto pelo método da filtração em gel (Sephadex G-200) como pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Determinaram o pH ótimo de atividade desta β -Galactosidase, cujo ótimo estava entre 3,6 e 5,0, e verificaram, ainda, que um máximo de atividade da enzima é obtido à temperatura de 65 °C. O rendimento final obtido foi de 4%, e o fator de purificação igual a 33,8 vezes.

PARK, De SANTI, e PASTORE(1979) selecionaram uma linhagem do fungo *Aspergillus oryzae*, normalmente utilizado para a produção industrial de α -amilase, e que também produz uma β -Galactosidase extracelular. Produziram extratos bruto da enzima por fermentação em meios semi-sólido e fermentação submersa em meio líquido. A estratégia de purificação envolveu a precipitação com sulfato de amônio, diálise, e cromatografia em colunas de DEAE-celulose, CM-celulose, e DEAE-Sephadex A-50. Determinaram que o pH ótimo para a enzima está na faixa de 3,5 a 8,0 e que a temperatura ótima é 55°C. Verificaram também que íons metálicos (0,01 a 1 mM) não tem efeito sobre a atividade da enzima. O peso molecular da enzima foi determinado por filtração em gel Sephadex G-200; obtiveram um valor de aproximadamente 90 kDa para o peso molecular. No final do processo obtiveram um fator de purificação igual a 252 vezes.

ANDREWS e LI(1994) relatam que a perda de galactose da hemicelulose da parede celular durante o período de amadurecimento de frutos climatéricos pode ser catalisada por diversas enzimas, entre elas a β -Galactosidase, cuja atividade está aumentada neste período. Removeram um extrato bruto de cerejas doces (fruto não-climatérico), em vários estágios de maturação fisiológica, e observaram que este extrato continha a enzima β -Galactosidase. A estratégia de purificação envolveu a precipitação com sulfato de amônio, diálise, um passo de cromatografia por troca iônica em DEAE-Sephadex A-50, e posteriormente a filtração em Sephadex G-75. A pureza da enzima entre os passos foi observada através de eletroforese em SDS-PAGE. Adicionalmente,

realizaram mais dois passos de filtração em gel Sephacryl S-200. A atividade específica da enzima foi aumentada em 22 vezes em relação ao extrato bruto. Eles concluíram que este valor é baixo em comparação ao obtido por outros autores. Esses autores explicam que isto pode ser devido à falta de um co-fator para a enzima, e que este co-fator pode estar presente no extrato bruto, mas pode não estar junto à enzima purificada. A faixa dominante no SDS-PAGE para a fração correspondente ao pico de atividade na saída da coluna de DEAE-celulose era de um peptídio com peso molecular calculado em 57 kDa. O máximo de atividade da β -Galactosidase no fruto ocorreu duas semanas antes da maturação fisiológica.

FISCHER, SCHECKERMANN, e WAGNER(1995) purificaram uma β -Galactosidase intracelular produzida pelo fungo *Thermomices lanuginosus*. Utilizaram uma estratégia de purificação que envolveu a precipitação por sulfato de amônio, cromatografia por interação hidrofóbica, e cromatografia por troca de íons. Através da eletroforese verificaram que a enzima é um dímero com peso molecular na faixa de 75 a 80 kDa por unidade, e ponto isoelétrico entre 4,4 e 4,5. A β -Galactosidase nativa foi identificada como sendo uma glicoproteína. O pH ótimo para atuação da enzima foi encontrado na faixa de 6,7 a 7,2, e a mesma mostrou-se estável na faixa de pH entre 6,0 e 9,0. Esta enzima, após o passo de precipitação, foi incubada a 50 °C por 191 horas; verificaram que 58% da atividade da enzima foi mantida no final do período de incubação.

DUTTA e MAJUMDER(1993) purificaram parcialmente e caracterizaram uma β -Galactosidase do tecido epidídimo de ratos. A estratégia de purificação envolveu a adsorção em gel de fosfato de cálcio, cromatografia por troca iônica em DEAE-celulose, filtração em gel Sephadex G-100, e cromatografia por afinidade em concanavalina A-agarose. Determinaram, por filtração em gel Sephadex G-100, que a enzima tem um peso molecular médio em torno de 50 kDa. A eluição da coluna por afinidade só foi possível em tampão contendo NaCl numa concentração de 0.3 mM. Esta enzima não é dependente

de íons metálicos para a sua atividade, e o pH ótimo dela está em torno de 7,0. Obtiveram um rendimento final de 76% e um fator de purificação de 402 vezes.

PISANI et al.(1990) purificaram uma β -Galactosidase termoestável produzida pela bactéria *Sulfolobus solfataricus*. O processo de purificação da enzima, que se encontrava no interior da célula da bactéria, foi iniciado com a produção de um extrato cru da enzima. A estratégia de purificação envolveu a cromatografia em coluna de DEAE-celulose, precipitação em pH 4.5, cromatografia por afinidade em Sepharose 4B, ativada com brometo de cianogênio e tendo como ligante o p-aminofenil- β -D-thiogalactopyranosideo, cromatografia em Sepharose Q, e finalmente uma etapa de ultrafiltração. O estudo do peso molecular, com a proteína na forma nativa, foi realizada numa coluna de filtração em gel de Superose 12, obtendo-se o valor igual a ± 240 kDa para o tetrâmero. O peso molecular das subunidades, que são idênticas, foi determinada por SDS-PAGE, obtendo-se uma banda única de proteína correspondente ao peso molecular 60 ± 2 kDa. O estudo de termoestabilidade revelou que a atividade a enzima foi totalmente perdida após 15 min a 100°C e 120 minutos a 95°C ; A meia vida da enzima a 75° , 80° , e 85°C era 24, 10 e 3 horas, respectivamente. O rendimento final obtido foi 28%, e o fator de purificação de 966 vezes.

2.7 Purificação de Enzimas Produzidas em Substrato Sólido

Enzimas produzidas por meio do cultivo em substrato sólido são parcialmente purificadas após a extração por lixiviação, empregando-se técnicas de precipitação por solventes, remoção de interferentes, e secagem(RAMAKRISHNA et al., 1982). A extração de substâncias produzidas em substrato sólido tem recebido atenção especial(LONSANE e KRIAHNAIAH, 1992). Se for necessário um elevado grau de pureza da enzima, torna-se necessária a utilização de técnicas de purificação mais sofisticadas(TAKUR et al., 1990).

ARECES et. al.(1998) tentaram purificar uma protease ácida, proveniente de um extrato bruto recolhido de um cultivo de *M. bacilliformis* em substrato sólido. Utilizaram um trocador de íons DEAE Celulose, e verificaram que muito pouca enzima era adsorvida por este trocador iônico. Concluíram que seria necessário um estudo mais detalhado do efeito das condições do extrato e dos métodos de pré-tratamento na comportamento cromatográfico da enzima.

Proteínas podem interagir com moléculas de tamanho pequeno que estejam presentes no extrato cru. Estas moléculas pequenas, tais como compostos fenólicos e quinonas, são provenientes do substrato sólido, visto que são comumente encontradas em extratos provenientes de plantas(GEGENHEIMER, 1990). Proteínas podem interagir com outras moléculas tais como as de taninos e polissacarídeos aniônicos que também estejam presentes. Estes compostos interagem com as proteínas por meio de pontes de hidrogênio, ligações iônicas, interação hidrofóbica, e também por ligações covalentes. Estas substâncias devem ser removidas antes de etapas de cromatografia(LOOMIS, 1974).

As plantas produzem uma variedade de compostos fenólicos, os quais interferem, frequentemente, de forma danosa na isolação tanto de enzimas como de organelas das plantas. Alguns tecidos de plantas contém elevado teor de taninos, de tal forma que as proteínas são precipitadas durante os procedimentos convencionais de extração, ao passo que outros fenóis presentes podem inativar ou modificar enzimas, contudo sem precipita-las. Diversos compostos fenólicos são conhecidos pelo potente efeito inibidor de enzimas, mesmo em concentrações menores que 1 mM(LOOMIS, 1969).

Polifenóis são classificados como ácidos fenólico e derivados, taninos, e flavonoides(SALUNKHE et al., 1981). JOOD et al.(1995) determinaram o teor de polifenóis de algumas espécies de grãos de cereais. Verificaram que grãos de trigo, milho, e sorgo possuem 482, 635, e 829 mg/100g, respectivamente.

De um ponto de vista comum, o termo tanino é utilizado para denotar um grupo de substâncias com um conjunto de propriedades comuns, mas não similares em estrutura. Entretanto, os taninos que ocorrem naturalmente em vegetais são definidos como compostos fenólicos solúveis em água, os quais possuem massa molecular na faixa de 500 a 3000 Da, e que possuem a capacidade de precipitar alcalóides, gelatina, e outras proteínas(SALUNKHE et al., 1981).

Fenóis combinam com proteínas em duas formas: reversivelmente através de pontes de hidrogênio, e de forma irreversível pela oxidação do mesmo, resultando em quinonas, com a subsequente condensação covalente juntamente com os grupos reativos da proteína(LOOMIS, 1969). Essas ligações covalentes podem ser permanentes. A ligação entre taninos e proteínas consiste na formação de múltiplas pontes de hidrogênio entre o grupo hidroxil fenolico do tanino e o grupo carbonil da ligação peptídica da proteína(OH, et al., 1980).

LOOMIS(1974) relata que este tipo de ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxil fenólico e a proteína é uma das mais fortes ligações de hidrogênio conhecidas, e que não pode ser dissociada por técnicas convencionais, tais como diálise e filtração em gel. O grupo hidroxil fenólico em pH elevado pode formar ligação iônica com compostos fenólicos do grupo fenilpropanóide, os quais contêm grupos carboxílicos, que poderão estar com carga negativa tanto abaixo como acima do pH neutro.

Polifenóis e outros materiais inibidores podem ser removidos do extrato cru através de diversas técnicas(FERNÁNDEZ-LAHORE et al., 1998). Dentre estas técnicas pode-se citar: complexação com polivinilpirrolidone (PVP); adsorção em resinas tais como XAD-2 e Dowex 1x8; precipitação com solventes(álcool, acetona); precipitação com sais tal como o sulfato de amônio; ultrafiltração e diafiltração.

FERNÁNDEZ-LAHORE et al.(1998) avaliaram a integração de técnicas de recuperação, concentração e purificação("downstream processing") de uma protease ácida

produzida por meio de cultivo de *Mucor bacilliformis* em substrato sólido(farelo de trigo). Estudaram a influência de diferentes tratamentos antes da etapa de cromatografia por troca iônica. Polifenóis e outros materiais inibidores foram removidos do extrato cru através de diversas técnicas. Essas técnicas incluíram: adsorção em resina Dowex 1x8; precipitação com solventes(álcool, acetona); precipitação com sulfato de amônio; ultrafiltração e diafiltração. Verificaram que era possível obter uma elevada porcentagem de recuperação na etapa de concentração utilizando-se a precipitação com álcool e acetona, e pela ultrafiltração e diafiltração na presença de NaCl. Entretanto, a diafiltração foi a técnica pré-cromatográfica selecionada para tratamento do extrato cru, visto que esta técnica melhorava a adsorção em resina de troca iônica.

HASLAM(1974) estudou, de forma quantitativa, a associação de alguns taninos naturais e sintéticos com a enzima β -Glucosidase(EC 3.2.1.21, peso molecular 120 kDa). Verificou que esses compostos não inibem a atividade da β -Glucosidase, apesar de poderem precipita-la pela formação do complexo proteína-polifenol.

PRICE e BUTLER(1977) desenvolveram uma técnica para distinguir, rapidamente, de forma visual, variedades de sorgo que apresentam zero, baixo, intermediário, moderadamente alto, e elevado teor de taninos, através de tons das cores amarelo, verde, e azul. Desenvolveram, ainda, um método espectrofotométrico que detecta baixas concentrações de taninos e de outros polifenóis, através da formação do complexo azul da Prússia.

2.8. Isoterma de Adsorção e Capacidade do Adsorvente

A capacidade de um adsorvente(resina) depende do peso molecular e da concentração de proteína em solução, das condições de adsorção(pH, força iônica e temperatura), bem como da porosidade desta matriz e da acessibilidade da proteína aos sítios de adsorção. Em particular o pH, a força iônica, e os contaminantes, se houverem,

deverão ser idênticos. A capacidade do adsorvente pode ser determinada por experimentos em batelada, ou ainda através de cromatografia por análise frontal (curvas de ruptura) (ROE, 1995).

Isoterma de equilíbrio é um termo utilizado para descrever a relação entre a quantidade de proteína ligada e a concentração de proteína que permanece em solução, para as condições estabelecidas para a adsorção (JAMES, 1994).

Na adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons considera-se, que a resina possui grupos funcionais com carga, e que estas cargas estão balanceadas por contra íons associados. Considera-se, ainda, que as moléculas de proteína estão ionizadas quando em solução.

Na adsorção no trocador de íons a molécula de proteína desloca o contra-íon associado com o grupo carregado do trocador. Para um trocador de íons equilibrado com contra-íons monovalentes este processo pode ser representado por um equilíbrio na seguinte forma (SKIDMORE et al., 1990):



em que A representa um sítio de adsorção no trocador, I representa os contra-íons, P é a molécula de proteína e n o número de cargas envolvidas na interação conforme a molécula de proteína adsorvida. Se a alteração da concentração de contra-íons I na solução é pequena, como resultado da adsorção da proteína na resina, e no caso da solução tamponante conter I , então o equilíbrio pode ser representado de forma simplificada por:



e assim a taxa de variação da concentração de proteína no adsorvente é dada por:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C (q_m - q) - k_2 q \quad (2.3)$$

em que C (mg.mL^{-1}) é a concentração de proteína em solução, k_1 ($\text{mL.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e k_2 (min^{-1}) são as constantes da reação de adsorção e de dessorção, q (mg.mL^{-1}) é concentração de proteína por unidade de volume adsorvente, q_m (mg.mL^{-1}) a capacidade máxima do adsorvente, e t (min.) representa o tempo. No equilíbrio, a equação 2.3 iguala-se a zero, e após um rearranjo das variáveis fica:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{\frac{k_1}{k_2} + C^*} \quad (2.4)$$

em que o superescrito * denota o valor no qual o equilíbrio é estabelecido entre as fases de sólido e de líquido. Fazendo-se $k_d = k_2/k_1$, e substituindo-o na equação 2.4 tem-se:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{k_d + C^*} \quad (2.5a)$$

em que k_d (mg.mL^{-1}) é a constante de dissociação do complexo proteína-adsorvente. A equação 2.5a tem a forma da isoterma de adsorção proposta por LANGMUIR(1916), a qual já foi utilizada para descrever a adsorção de diversas proteínas em adsorventes trocadores de íons. Alternativamente podemos escrever a equação 2.5a na forma:

$$\Gamma^* = \frac{\Gamma_m C^*}{k_d + C^*} \quad (2.5b)$$

em que Γ^* (mg.g^{-1}) é a quantidade de adsorvato por unidade de massa do adsorvente, e Γ_m (mg.g^{-1}) é a capacidade máxima do adsorvente.

Um componente chave para modelar de forma acurada o processo cromatográfico são os dados que descrevem o equilíbrio na adsorção de cada um dos componentes do sistema que constitui tanto o material de alimentação da coluna como os componentes da fase móvel na coluna. Entretanto, poucos esforços são direcionados para a determinação de isotermas de adsorção em sistemas com multicomponentes, principalmente proteínas(JACOBSON,1990).

2.9. Modelos Matemáticos Aplicados à Adsorção

2.9.1. Adsorção em Tanques Agitados

Um sistema de adsorção em batelada, equipado com um dispositivo de agitação, constitui um tanque agitado. O volume total do tanque é $V(\text{mL})$. Neste tanque um volume de adsorvente, $v(\text{mL})$ pode ser colocado em contato com um volume de solução protéica de concentração $C_o(\text{mg.mL}^{-1})$. A concentração de proteína na fase de líquido diminui com o tempo, e após um período de tempo será estabelecido um equilíbrio entre a concentração de proteína na fase de líquido (solução protéica) e na fase sólida (adsorvente). Para um intervalo de tempo $\Delta t(\text{min.})$ medido a partir do tempo $t=0$, a concentração de adsorvato (proteína) no adsorvente pode ser calculada através de um balanço de massa no tanque, o qual resulta:

$$q = \frac{V}{v}(C_o - C_b) \quad (2.6)$$

em que C_b (mg.mL^{-1}) é a concentração de adsorvato em solução no final do intervalo de tempo considerado.

2.9.1.1. Modelo de Adsorção com Cinética a Taxa Constante

CHASE(1984) apresentou um modelo empírico para descrever o processo de adsorção e dessorção, sendo que a taxa constante da cinética é determinada experimentalmente. De acordo com este modelo, a taxa de reação na superfície é baixa em comparação com a taxa de transferência de massa, de tal forma que a concentração do adsorvato é a mesma fora e no interior dos poros da partícula de adsorvente. A função da taxa leva em conta a natureza reversível da interação adsorvente-adsorvato.

Na adsorção num tanque agitado, a taxa de variação da concentração de proteína na fase de líquido pode ser estabelecida a partir das equações 2.3 e 2.6, resultando em:

$$\frac{dC_b}{dt} = -(k_1 q_m \eta) C_b + k_1 (C_0 - C_b) C_b + (k_1 k_d)(C_0 - C_b) \quad (2.7)$$

em que $\eta = v/V$ representa a relação entre o volume da fase de sólido(adsorvente) e o volume da fase de líquido(solução protéica) no tanque. A solução analítica da equação 2.7, apresentada por CHASE(1990), é:

$$C_b = C_0 - \eta \left[\frac{(b+a)(1 - \exp\{-2ak_1\eta t\})}{\left(\frac{b+a}{b-a}\right) - \exp\{-2ak_1\eta t\}} \right] \quad (2.8)$$

em que

$$a^2 = b^2 - \left(\frac{C_0}{\eta}\right) q_m \quad (2.9)$$

e,

$$b = \frac{1}{2} \left(\frac{C_0}{\eta} + q_m + \frac{k_d}{\eta} \right) \quad (2.10)$$

2.9.1.2 Modelo com Transferência de Massa no Filme e Difusão nos Poros

ARVE e LIAPIS(1987) apresentaram e utilizaram um modelo geral para prever o comportamento dinâmico da adsorção em tanques agitados. Este modelo leva em consideração as resistências à transferência de massa tanto difusional(difusão das moléculas de proteína na fase de líquido contida nos poros do adsorvente) como no filme de líquido na superfície do adsorvente. Leva em consideração, ainda, a taxa de interação(reação) entre o adsorvato e o adsorvente. Neste modelo a transferência de

massa para a superfície do adsorvente é governada pelo modelo de transferência de massa no filme de líquido, caracterizado por um coeficiente de transferência de massa, $k_f(\text{cm}.\text{min}^{-1})$. A difusão das moléculas de proteína nos poros do adsorvente é caracterizada pelo coeficiente de difusão efetivo, $D_e(\text{cm}^2.\text{min}^{-1})$. A reação na superfície do adsorvente, entre este e o adsorvato, é descrita por uma reação reversível de segunda ordem. O comportamento do equilíbrio entre o adsorvente e o adsorvato é representado pelo modelo de LANGMUIR(1916). As partículas de adsorvente são consideradas esféricas.

HORSTMANN e CHASE(1989) e CARRÈRE(1993) utilizaram um modelo similar para a adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons. As equações do modelo englobam um balanço de massa sobre a partícula de sólido, e um balanço de massa para a fase de líquido externa ao adsorvente.

2.9.1.3. Balanço de Massa na Partícula

O balanço de massa sobre a partícula de sólido corresponde a equação diferencial que descreve a difusão do soluto nos poros da partícula, ou seja:

$$\varepsilon_i \frac{\partial C_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_e \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \rho_s (1 - \varepsilon_i) \frac{\partial \Gamma_i}{\partial t} \quad (2.11)$$

em que ε_i é a porosidade da partícula, $C_i(\text{mg}.\text{mL}^{-1})$ é a concentração de proteína na fase de líquido no interior dos poros da partícula, $\Gamma_i(\text{mg}.\text{g}^{-1})$ é a concentração de proteína por unidade de massa da fase sólida, $t(\text{min})$ e $r(\text{cm})$ são as variáveis temporal e espacial (radial), respectivamente, e $\rho_s(\text{g}.\text{mL}^{-1})$ é a densidade global de sólido do adsorvente(SANTACESARIA et al., 1982).

A condição inicial é:

$$t = 0 \quad C_i = 0 \quad (2.12)$$

e as condições de contorno são,

no centro da partícula:

$$r = 0 \quad \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad (2.13)$$

na superfície da partícula:

$$r = R \quad \varepsilon_i D_{ef} \left(\frac{\partial C_i}{\partial r} \right)_{|r=R} = k_f (C_b - C_i)_{|r=R} \quad (2.14)$$

em que $R(\text{cm})$ é o raio da partícula. De acordo com a equação 2.14, tem-se que a taxa de transferência de massa através da película líquida(filme) está relacionada com a concentração global de proteína na fase líquida, C_b , e com a concentração de proteína na fase líquida nos poros da partícula, $C_i|_{r=R}$.

A cinética de adsorção da proteína sobre a superfície do sólido nos poros pode ser escrita como (CARRÈRE, 1993):

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 C_i (q_m - q_i) - k_2 q_i \quad (2.15)$$

em que k_1 e k_2 correspondem as constantes cinéticas de adsorção e dessorção, respectivamente.

Considerando-se que a taxa de adsorção da proteína na superfície é muito rápida, pode-se supor que a relação entre q_i e C_i em cada instante é dada pela relação de equilíbrio representada pela isoterma de Langmuir, cuja expressão é:

$$q_i = \frac{q_m C_i}{k_d + C_i} \quad (2.16)$$

Logo, pode-se expressar $\partial q_i / \partial t$ como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{dq_i}{dC_i} \frac{\partial C_i}{\partial t} = f'(C_i) \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (2.17)$$

em que:

$$\frac{dq_i}{dC_i} = \frac{q_m k_d}{(k_d + C_i)^2} \quad (2.18)$$

Dessa forma, a equação 2.18 fica:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{q_m k_d}{(k_d + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (2.19)$$

Substituindo-se a equação 2.19 na equação 2.11, tem-se:

$$\varepsilon_i \frac{\partial C_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{q_m k_d}{(k_d + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (2.20)$$

2.9.1.4. Balanço de Massa na Fase de Líquido

Para a adsorção e dessorção num tanque agitado, a taxa de variação da concentração global de proteína, C_b , é representada por (HORSTMANN e CHASE, 1989):

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{3vk_f}{RV} (C_b - C_i)_{|r=R} \quad (2.21)$$

em que $v(\text{mL})$ é o volume de adsorvente, e $V(\text{mL})$ é o volume de líquido (fase externa), com a seguinte condição inicial:

$$t = 0 \quad C_b = C_0 \quad (2.22)$$

2.9.2. Adsorção em Coluna Cromatográfica

A equação do balanço material na coluna, inclui a dispersão axial e a suposição de taxa de escoamento constante (SANTACESARIA et al., 1982),

$$\varepsilon_e \frac{\partial C_e}{\partial t} = \varepsilon_e D_a \frac{\partial^2 C_e}{\partial z^2} - v_s \frac{\partial C_e}{\partial z} - \frac{3k_L}{R} (1 - \varepsilon_e) (C_e - C_i)_{|r=R} \quad (2.23)$$

em que $C_e(\text{mg.mL}^{-1})$ é a concentração de adsorvato na fase externa (fase de líquido), $C_i(\text{mg.mL}^{-1})$ é a concentração de adsorvato na fase de líquido interna ao adsorvente, ε_e é a

porosidade do leito, $D_a(\text{cm}^2.\text{min}^{-1})$ é o coeficiente de dispersão axial, $v_s(\text{cm}.\text{min}^{-1})$ é a velocidade superficial, $k_L(\text{cm}.\text{min}^{-1})$ é o coeficiente global de transferência de massa, $R(\text{cm})$ é o raio da partícula, e $z(\text{cm})$ é a distância axial ao longo do leito empacotado de comprimento $Z(\text{cm})$. Aplica-se à equação 2.23 as condições de contorno de Danckwartz,

$$v_s C_0 = v_s (C_e)_{|z=0} - D_a \left(\frac{\partial C_e}{\partial z} \right)_{|z=0} \quad (2.24)$$

$$\left(\frac{\partial C_e}{\partial z} \right)_{|z=Z} = 0 \quad t > 0 \quad (2.25)$$

e a condição inicial,

$$t = 0 \quad \forall z \quad C_e = 0 \quad C_i = 0 \quad (2.26)$$

A dificuldade numérica envolvida para a solução dos sistema de equações diferenciais parciais formado pelas equações 2.11 e 2.23 pode ser contornada pela simplificação do modelo referente à difusão nos poros, englobando-se os parâmetros envolvidos na transferência de massa.

Desta forma a dependência da concentração interna C_i com o raio da partícula de adsorvente é modificada, substituindo-se a função $C_i(r, t)$ por uma concentração média no volume, $\bar{C}_i(t)$, definida pela expressão:

$$\bar{C}_i(t) = \frac{1}{V_p} \int_{V_p} C_i(r, t) dV_p \quad (2.27)$$

Aplicando-se o operador do volume médio ao modelo para a difusão nos poros da partícula, tem-se:

$$\varepsilon_i \frac{d\bar{C}_i}{dt} = \frac{3k_L}{R} (C_e - \bar{C}_i) - \frac{d\bar{q}_i}{dt} \quad (2.28)$$

em que

$$\frac{d\bar{q}_i}{dt} = f'(\bar{C}_i) \frac{d\bar{C}_i}{dt} \quad (2.29)$$

como anteriormente utilizado na modelagem do tanque agitado. Para este modelo tem-se a seguinte condição inicial:

$$t = 0 \quad \bar{C}_i = 0 \quad (2.30)$$

Na equação 2.23 o coeficiente global de transferência de massa, k_L , é definido pela relação:

$$\frac{1}{k_L} = \frac{1}{k_e} + \frac{1}{\varepsilon_i k_i} \quad (2.31)$$

em que k_e e k_i são os coeficientes de transferência de massa na fase de líquido externa e interna (nos poros), respectivamente.

Na obtenção do modelo global foram introduzidas duas aproximações. A primeira, para a cinética de adsorção

$$\frac{1}{V_p} \int_{V_p} f'(C_i) \frac{\partial C_i}{\partial t} dV_p \cong f'(\bar{C}_i) \frac{d\bar{C}_i}{dt} \quad (2.32)$$

e a segunda para avaliar o coeficiente global de transferência de massa, k_L . Em particular, no lado direito da equação 2.31 em que aparece o coeficiente de transferência de massa k_i , cuja definição é:

$$k_i = \frac{D_{ef} \left(\frac{\partial C_i}{\partial r} \right)_{r=R}}{(C_e - \bar{C}_i)} \quad (2.33)$$

e o valor exato de k_i é, então, função do tempo, e somente poderá ser avaliado através do modelo completo.

2.9.2.1. Modelo Simplificado para a Coluna Cromatográfica

CHASE(1984) adaptou a teoria das taxas aplicada à cromatografia, em vez da teoria dos pratos, para modelar o desempenho de uma coluna cromatográfica. Esta

teoria consiste num conjunto de equações referentes à balanços de massa, juntamente com condições apropriadas tanto para o contorno como para o início. Neste modelo, a equação da continuidade da fase móvel é

$$\frac{\partial C_e}{\partial t} = D_a \frac{\partial^2 C_e}{\partial z^2} - u \frac{\partial C_e}{\partial z} - \mathfrak{R} \quad (2.34)$$

em que D_a é o coeficiente de dispersão axial, $u(\text{cm.min}^{-1})$ é a velocidade linear ($v_s = u \cdot \varepsilon_e$), \mathfrak{R} é a taxa de transferência de massa na interface, z é a distância axial ao longo do leito, e t o tempo. Deve-se notar que a equação 2.34 é similar à equação 2.23.

Diversos modelos são apresentados na literatura, com base na teoria das taxas, para representar \mathfrak{R} , e que podem ser utilizados na equação 2.34. Alguns destes modelos requerem conhecimento de parâmetros associados com a natureza física do adsorvente, os quais nem sempre podem ser prontamente medidos. Algumas soluções propostas para a equação 2.34 somente são aplicadas à sistemas representados por isotermas lineares. Dessa forma, CHASE(1984) supôs que a transferência de massa na interface sólido-líquido numa coluna cromatográfica pode ser descrita por

$$\mathfrak{R} = k_1 C_e (q_m - q) - k_2 q \quad (2.35)$$

Supondo-se que a dispersão axial na coluna pode ser desprezada, que as condições de contorno são que a coluna está inicialmente dedicada a ligar o adsorvato, e que a concentração de adsorvato na alimentação, $C_0(\text{mg.mL}^{-1})$ é constante, CHASE(1984), BOYER e HSU(1992), obtiveram uma solução analítica para as equações 2.34 e 2.35. A solução obtida é idêntica, na forma, àquela obtida por THOMAS(1944). A solução obtida por BOYER e HSU(1992) é:

$$\frac{C_e}{C_0} = \frac{J(n/r, nT)}{J(n/r, nT) + [1 - J(n, nT/r)] \cdot \exp[(1 - r^{-1})(n - nT)]} \quad (2.36)$$

em que

$$r = 1 + \frac{C_0}{k_d} \quad (2.37)$$

$$n = (q_m k_1 h)(1 - \varepsilon_e) \frac{A_c}{Q} \quad (2.38)$$

$$T = \frac{(k_d + C_0)}{(1 - \varepsilon_e) q_m} \left(\frac{Qt}{A_c h} - \varepsilon_e \right) \quad (2.39)$$

A coluna cromatográfica empacotada(leito de adsorvente) possui altura $h(\text{cm})$, área da seção transversal $A_c(\text{cm}^2)$, e a vazão volumétrica através da coluna é $Q(\text{mL} \cdot \text{min}^{-1})$. A função $J(d, e)$, para as variáveis (d, e) é:

$$J(\alpha, \beta) = 1 - e^{-\beta} \int_0^{\alpha} e^{-\xi} I_0(2\sqrt{\beta\xi}) d\xi \quad (2.40)$$

Os valores de q_m , k_d e k_1 usados nas equações acima podem ser obtidos através de experimentos em batelada, realizados em pequena escala.

2.10. Escoamento da Fase de Líquido numa Coluna Cromatográfica

O escoamento da fase de líquido na coluna cromatográfica, no caso de interesse deste trabalho é o tampão contendo diversa espécies químicas, não tem comportamento ideal. O desvio do comportamento ideal pode ser devido a formação de canais, criação de regiões de estagnação, imperfeições na distribuição do fluido na entrada deste no leito de partículas, entre outros fatores.

Os problemas de escoamento não-ideal estão intimamente ligados ao aumento de escala, visto que esta operação depende, em grande parte, de possuímos o controle de todas as variáveis mais importantes envolvidas no processo. Frequentemente, o fator não-controlado no aumento de escala é a grandeza de não idealidade do escoamento e, esta, infelizmente, com certa frequência, é muito diferente para unidades pequenas ou grandes(LEVENSPIEL, 1974).

2.10.1. Distribuição do Tempo de Residência

Nem sempre é possível saber, realmente, a distribuição de velocidades da fase de líquido no interior do leito de partículas numa coluna cromatográfica. Em muitos casos não é necessário, realmente, saber muito; basta sabermos por quanto tempo as moléculas individuais permanecem no interior do leito de partículas, ou qual é a distribuição dos tempos de residência do fluido que está escoando. Essa informação pode ser obtida facilmente por um método de investigação amplamente usado: o teste de estímulo e resposta(LEVENSPIEL,1974).

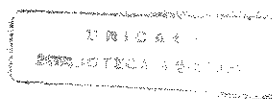
Moléculas do fluido que percorrem diferentes caminhos no interior do leito de partículas na coluna cromatográfica podem gastar tempos diferentes para passarem através do mesmo. A distribuição desses tempos – para a corrente de fluido que deixa a coluna – é denominada de distribuição de idade de saída, E , ou distribuição de tempo de residência (DTR) do fluido. O termo idade, neste caso, é utilizado para representar o intervalo de tempo que um elemento da corrente de fluido permaneceu no interior da coluna.

É conveniente representar a DTR do fluido de tal forma que a área sob a curva seja unitária,

$$\int_0^{\infty} E(t)dt = 1 \quad (2.41)$$

Este procedimento é denominado de normalização da distribuição. Na Figura 2.3 está representada a curva E de distribuição de idade de saída para um fluido escoando através de um leito de partículas numa coluna cromatográfica.

Quando se faz a caracterização do grau de não-idealidade do escoamento através da função de distribuição de idade de saída, deve-se saber como avaliar E para o escoamento em questão. Para essa finalidade faz-se uso de um certo número de técnicas



experimentais que são denominadas de técnicas de estímulo e resposta. Perturba-se o sistema e verifica-se como ele responde ao estímulo. Analisando-se a resposta tem-se a informação desejada a respeito do sistema.

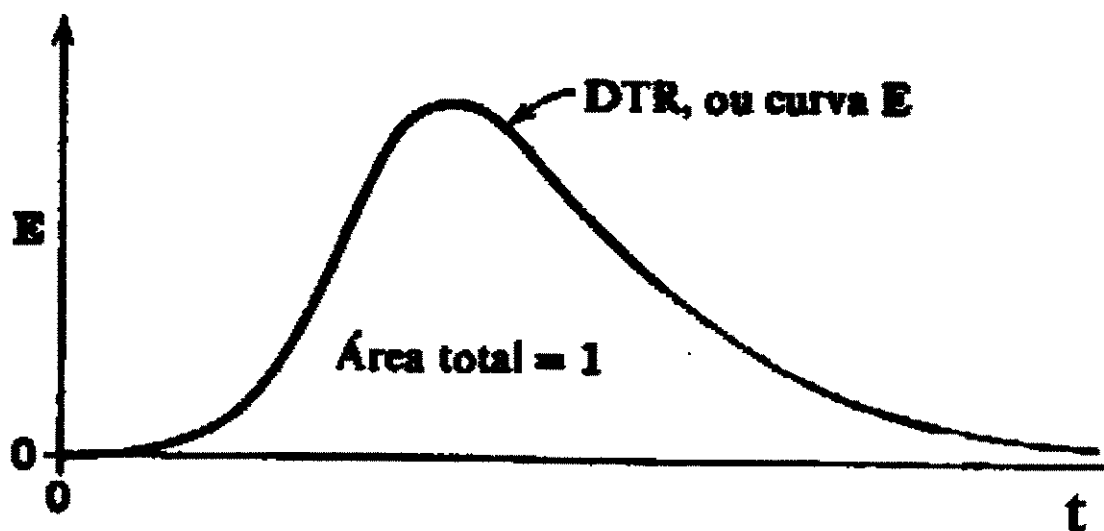


Figura 2.3 – Curva de distribuição de idade de saída, E , para um fluido escoando através de um leito de partículas numa coluna cromatográfica..

O estímulo pode ser a entrada de um traçador no fluido que entra na coluna cromatográfica, enquanto que a resposta é um registro de tempo do traçador que deixa a coluna. Qualquer substância que possa ser detectada e que não perturbe o escoamento na coluna, pode ser usada como um traçador. Alguns tipos de sinal de entrada podem ser utilizados, tais como: casual, periódico, em degrau, e pulsante.

Introduzindo-se à entrada da corrente fluida o traçador na forma de um sinal pulsante ideal, tem-se o que é denominado de função delta de Dirac ou impulso. A resposta obtida na forma normalizada é denominada de curva C. A normalização é efetuada pela divisão da concentração medida pela vazão total Q . Na Figura 2.4 está representada a curva C e suas propriedades.

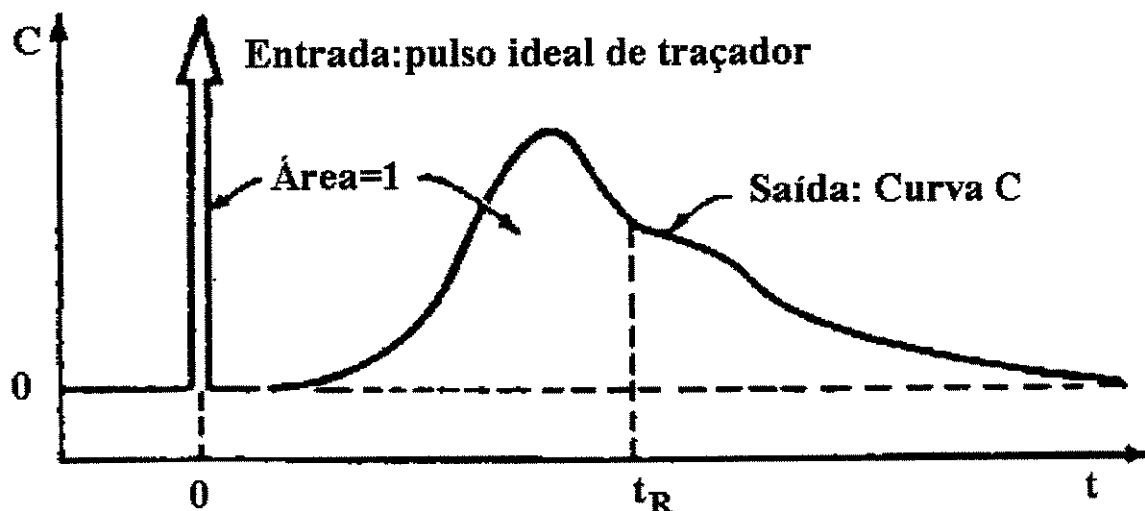


Figura 2.4 - Sinal típico da curva C , obtido como resposta a um sinal de entrada tipo pulso ideal.

Para relacionar E com C para o escoamento em regime permanente, é importante notar que a DTR para qualquer lote de fluido que entra deve ser a mesma que para qualquer lote que sai, para não contrariar a suposição de regime permanente. Se introduzirmos na coluna, no tempo $t=0$, um impulso de um fluido traçador, então a curva C registrará, para esse traçador, o instante no qual as moléculas saem da coluna. Isso quer dizer que a curva C representa a distribuição de idades. Desde que a curva C representa a DTR para um lote particular de fluido que entra, ela pode também representar a DTR para qualquer outro lote, em particular. Dessa forma, $C=E$, e a curva C dá diretamente a distribuição de idades na saída.

2.10.2. Análise da Distribuição dos Tempos de Residência

Utilizando-se de procedimentos estatísticos, caracteriza-se a função de distribuição de tempos de residência (DTR) em termos de seus parâmetros tais como o tempo médio da distribuição, a dispersão do tempo médio e/ou cauda da distribuição. Os momentos da DTR são definidos da seguinte forma:

$$M_{0_1} = \int_0^{\infty} t^k E(t) dt \quad (2.42)$$

em que k é a ordem do momento; $k=1$ indica o tempo de retenção médio, t_R , e $k=2$ indica a variância, σ^2 , para o momento centrado em relação ao tempo de retenção médio. Dessa forma, o primeiro momento é representado pela expressão:

$$M_{0_1} = t_R = \frac{\int_0^{\infty} t C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (2.43)$$

e o segundo por

$$\sigma^2 = M_{0_2} - (M_{0_1})^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - t_R)^2 C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (2.44)$$

ou,

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} t^2 C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} - t_R^2 \quad (2.45)$$

em que σ^2 é a variância, a qual representa o quadrado da amplitude da distribuição e tem dimensão de tempo ao quadrado. É particularmente útil quando pretende-se o ajuste de curvas experimentais a uma família de curvas teóricas.

As equações 2.43 e 2.45, podem ser representadas na forma discretizada,

$$t_R \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} \quad (2.46)$$

$$\sigma^2 \cong \frac{\sum_{i=1}^n t_i^2 C_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} - t_R^2 \quad (2.47)$$

2.10.3. Aplicação do método das duas medidas

Os dados experimentais não permitem ter acesso direto à DTR, mas sim às respostas transientes de uma dada excitação. A aplicação do método das duas medidas se fundamenta no conhecimento dos momentos de primeira e de segunda ordem das curvas $C(t)$, uma obtida com a coluna sem o leito de adsorvente, e outra com a coluna contendo o leito, respectivamente. A Figura 2.5 ilustra a operação nas duas condições.

A relação entre esses momentos nos fornece informações intrínsecas do sistema através das relações:

$$M_{0_1} = M_{0_{1,c}} - M_{0_{1,b}} \quad (2.48)$$

$$\sigma_1^2 = \sigma_{1,c}^2 - \sigma_{1,b}^2 \quad (2.49)$$

As relações 2.48 e 2.49, fornecem respectivamente o tempo de retenção e a variância do sistema.

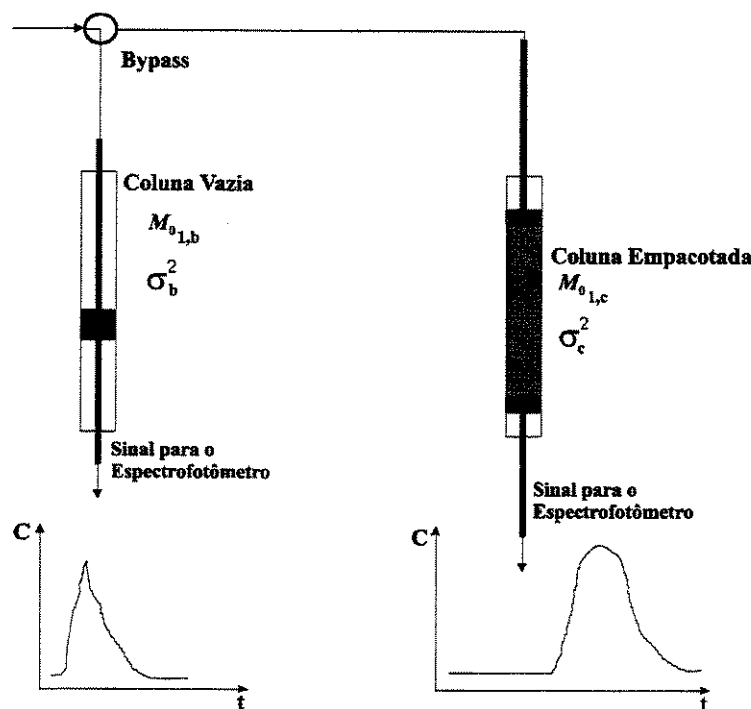


Figura 2.5 - Modo de operação: (a) coluna sem leito; (b) coluna com o leito(resina)

2.10.4. Modelo de Escoamento com Dispersão

O modelo de dispersão é baseado no conceito de cromatografia, e envolve as fases estacionária e móvel. A fase estacionária corresponde ao líquido no interior do adsorvente, e a fase móvel ao líquido no espaço intersticial às partículas.

O balanço de massa do soluto(traçador) na fase móvel é expresso pela equação 2.50, supondo-se que a geometria da partícula é esférica, e que o soluto não tem interação específica com o sólido adsorvente(NAKANISHI et al., 1977; FURUSAWA et al., 1976):

$$\varepsilon_e \frac{\partial C_e}{\partial t} = \varepsilon_e D_a \frac{\partial^2 C_e}{\partial z^2} - v_s \frac{\partial C_e}{\partial z} - \frac{3k_f}{R} (1 - \varepsilon_e)(C_e - C_i)_{|r=R} \quad (2.50)$$

em que $C_e(\text{mg.mL}^{-1})$ é a concentração de traçador na fase de líquido externa, $C_i(\text{mg.mL}^{-1})$ é a concentração do traçador nos poros da fase estacionária, k_f é o coeficiente de

transferência de massa. O balanço de massa na partícula é expresso por (FURUSAWA et al., 1976):

$$\varepsilon_i \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_e \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \rho_p \frac{\partial \Gamma_i}{\partial t} \quad (2.51)$$

e ultimo termo do lado direito está relacionado com a taxa de adsorção de acordo com a expressão:

$$\rho_p \frac{\partial \Gamma_i}{\partial t} = \rho_p k_a \left(C_i - \frac{\Gamma_i}{K_a} \right) \quad (2.52)$$

que está restrita à condição de cinética de adsorção reversível de primeira ordem. Nestas equações, $k_a(\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1})$ é a constante que representa a taxa de adsorção, $K_a(\text{mL.g}^{-1})$ é a constante de equilíbrio na adsorção, $\rho_p(\text{g.mL}^{-1})$ é a densidade aparente da partícula de adsorvente, e $\Gamma_i(\text{mg.g}^{-1})$ é a concentração de adsorvato adsorvido na superfície dos poros.

As equações 2.50 e 2.51 obedecem as condições iniciais e condições de contorno especificadas a seguir,

$$t = 0 \quad z \geq 0 \quad C_e = 0 \quad (2.53)$$

$$t = 0 \quad r \geq 0 \quad C_i = 0 \quad (2.54)$$

$$t > 0 \quad r = 0 \quad \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad (2.55)$$

$$0 \leq t \leq t_0 \quad z = 0 \quad C_e = C_0 \quad (2.56)$$

$$t > t_0 \quad z = 0 \quad C_e = 0 \quad (2.57)$$

$$k_f (C_e - C_i)_{|r=R} = D_e \left(\frac{\partial C_i}{\partial r} \right)_{|r=R} \quad (2.58)$$

O sistema de equações acima pode ser resolvido aplicando a transformada de Laplace(FURUSAWA et al., 1976). As derivadas de primeira e segunda ordem da solução, conforme o teorema de VAN DER LAAN(1957), representam os momentos de primeira e segunda ordem, de acordo com a expressão:

$$M_{0_k} = (-1)^k \left(\frac{\partial^k G(s)}{\partial s^k} \right)_{s=0} \quad (2.59)$$

FURUSAWA et al.(1976), e ARNOLD et al.(1985) apresentaram como solução para os momentos as seguintes expressões:

$$M_{0_1} = \frac{h}{u} \{1 + \delta_0\} + \frac{t_0}{2} \quad (2.60)$$

$$\sigma^2 = \frac{2h}{u} \left\{ \delta_1 + \frac{D_a}{\varepsilon_e} (1 + \delta_0)^2 \frac{1}{u^2} \right\} + \frac{t_0^2}{12} \quad (2.61)$$

em que

$$\delta_0 = \frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e} \varepsilon_i \left\{ 1 + \frac{\rho_p}{\varepsilon_i} K_a \right\} \quad (2.62)$$

e

$$\delta_1 = \frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e} \varepsilon_i \left\{ \frac{\rho_p}{\varepsilon_i} \frac{K_a^2}{k_a} + \frac{R^2 \varepsilon_i}{15} \left(1 + \frac{\rho_p}{\varepsilon_i} K_a \right)^2 \left(\frac{1}{D_e} + \frac{5}{k_f R} \right) \right\} \quad (2.63)$$

A aplicação de um traçador que não seja adsorvido, ou seja, $K_a=0$, conduz à simplificação das equações 2.60 a 2.63, resultando:

$$M_{0_1} = \frac{h}{v_s} \{ \varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) \varepsilon_i \} + \frac{t_0}{2} \quad (2.64)$$

$$\sigma^2 = \frac{2h}{v_s} \left\{ \frac{D_a}{(v_s)^2} [\varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) \varepsilon_i]^2 \right\} + \frac{(t_0)^2}{12} \quad (2.65)$$

Aplicando-se ao sistema(coluna empacotada com resina) dois traçadores distintos, ou seja, um que possa penetrar nos poros do adsorvente(substância com peso molecular pequeno, exemplo acetona) e outro que não possa penetrar nos poros do adsorvente(substância de elevado peso molecular, exemplo dextrana-blue), pode-se obter a porosidade do leito, ε_e , e calcular a porosidade da partícula, ε_i , utilizando-se a equação 2.64. A equação 2.65 permite calcular o coeficiente de dispersão axial, D_a .

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção de β -Galactosidase de *Scopulariopsis sp.*

Utilizou-se neste trabalho uma linhagem de fungo *Scopulariopsis sp.* (ATCC 44206), produtor de uma β -Galactosidase extracelular. A mesma linhagem selecionada e utilizada por PASTORE(1982).

A enzima β -Galactosidase foi produzida através de cultivo do fungo *Scopulariopsis sp.* em substrato sólido, composto de farelo de trigo e água na proporção de 1:1 em peso. Preparou-se tubos de 20 mL com um meio de cultura esterilizado(PDA-Potato, Dextrose, Agar), os quais foram inoculados com esporos do fungo *Scopulariopsis sp.* . Esses tubos foram incubados por um período de uma semana à 30°C, para a produção de esporos do referido fungo.

Preparou-se 45 frascos Erlenmeyers contendo, cada um, 25g de substrato sólido. Esterilizou-se os frascos em autoclave à 121°C por um período de 20 minutos.

Após a incubação do fungo no meio de cultura PDA, mantendo-se a assepsia, adicionou-se 10 ml de água deionizada e esterilizada a cada um dos tubos de cultivo, para a remoção dos esporos do fungo. A suspensão de esporos de todos os tubos foi reservada num frasco Erlenmeyer.

Adicionou-se 1 mL de suspensão de esporos a cada um dos se 45 frascos Erlenmeyers contendo o substrato sólido. Os frascos foram incubados a 30°C por um período de 7 dias, para que o fungo utilizasse o substrato e produzisse a enzima β -Galactosidase. Após a incubação, adicionou-se 100 ml de água destilada a cada um dos frascos Erlenmeyer, e o conteúdo(meio de cultura fermentado juntamente com a massa micelar do fungo) foi triturado com bastão de vidro.

Após um período de 1 hora em água, o conteúdo dos frascos (farelo e água) foi filtrado em manta de algodão, e o líquido recolhido foi mantido em banho de gelo. O filtrado contendo a enzima foi submetido à precipitação com álcool etílico(99,5% v/v, previamente condicionado em geladeira a 4°C), de forma que a mistura final álcool-água estivesse numa proporção de 70% em volume. A operação foi realizada em banho de gelo. Após a precipitação, que variou de uma a duas horas, o sobrenadante foi removido, e o precipitado reservado. O precipitado recolhido foi centrifugado(10000 rpm por 10 minutos), e o sobrenadante descartado.

Os sólidos remanescentes foram recolhidos, e submetidos à desidratação por liofilização(Liofilizador Yamato modelo DC 41). Após a secagem os sólidos foram triturados num almofariz, e o pó obtido foi, então, colocado num frasco de vidro e armazenado em geladeira. Dessa forma, obteve-se um preparado bruto de β -Galactosidase de *Scopulariopsis sp.*. Esse extrato bruto foi armazenado à temperatura abaixo de 0°C durante o período de execução deste trabalho de tese.

3.2. Determinação de Atividade da β -Galactosidase

A atividade da enzima β -Galactosidase foi determinada com a utilização do ONPG(*o*-Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) como substrato da enzima. O produto da reação enzimática é o cromóforo ONP, *o*-Nitrofenol.

Desenvolveu-se um ensaio de atividade enzimática com base no utilizado por PASTORE(1982). O ensaio consiste em colocar-se num tubo com tampa um determinado volume de solução contendo β -Galactosidase(alguns micro litros), completar o volume para 1,7 mL utilizando-se tampão acetato(0,1 M, pH 5,0), adicionar 0,15 mL de solução a 0,25% do substrato *o*-Nitrofenil β -D-Galactopyranosídeo fornecido pela SIGMA® (ONPG, preparado em tampão acetado), incubar à 60 °C em banho agitado por 15 minutos, encerrar a reação com 0,15 mL de solução de carbonato de sódio a 10%(preparado em tampão acetato), e resfriar os tubos em banho à temperatura ambiente.

O produto da reação enzimática é o *o*-Nitrofenol, coeficiente de extinção $K_w(\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1})$, que também foi determinado experimentalmente. O *o*-Nitrofenol tem cor amarelo. A absorbância da solução de cada tubo de reação enzimática foi lida no comprimento de onda $\lambda = 420 \text{ nm}$, contra um branco de água destilada, utilizando-se um espectrofotômetro (Hitachi® modelo U-2000).

Determinou-se, também experimentalmente, qual o valor máximo de absorbância lida que está na faixa linear do gráfico absorbância versus concentração da enzima no ensaio de atividade enzimática. Uma unidade de atividade da enzima β -Galactosidase produzida pelo *Scopulariopsis sp.* é definida como sendo 1 μmol de *o*-Nitro-fenol produzido por minuto sob as condições do ensaio.

3.3. Determinação da Concentração de Proteína Total

A concentração de proteína presente em soluções contendo β -Galactosidase foi determinada através do método de BRADFORD(1976), executado em microensaio, utilizando-se a proteína BSA(albumina do soro bovino) como referência. Construiu-se uma curva de calibração, absorbância *versus* concentração de proteína, para a faixa de 1 a 10 μ g de BSA por mL. Dessa forma foi possível determinar o coeficiente de extinção da proteína referência. O microensaio consiste, basicamente, em colocar, num tubo do tipo eppendorf, alguns microlitros de solução protéica, completar o volume para 0,8 mL com tampão, e adicionar-se 0,2 mL do reagente contendo corante Coomassie Blue (Bio-Rad® catalogo 500-0006), agitar, esperar pelo menos 5 minutos para ler a absorbância no comprimento de onda $\lambda = 595$ nm, contra branco preparado sem a solução protéica.

3.4. Preparo de Soluções Contendo β -Galactosidase

A dissolução simples do material bruto liofilizado em tampão(Tis-HCl 30 mM, pH 7,5) produz um caldo com turbidez elevada, com a presença de materiais em suspensão. Dessa forma, submeteu-se o caldo à centrifugação (12500rpm, centrífuga Hitachi® modelo CF 15D). No caldo obtido, de cor amarelo forte, observava-se, ainda, a existência de algum material em suspensão.

Foram realizados ensaios preliminares de adsorção em Accell® Plus QMA, tanto em batelada como em coluna cromatográfica, utilizando-se este caldo. Os resultados obtidos mostraram que a adsorção tanto de atividade da enzima como de proteína total era praticamente zero.

Observou-se que a dissolução do material bruto liofilizado em tampão acetado 100 mM pH 5,0 ocorria a precipitação dos insolúveis, e que a quantidade total de

atividade da enzima em solução permanecia inalterada. Entretanto, a quantidade total de proteína era reduzida. Assim, submetendo-se o caldo bruto à centrifugação obteve-se uma solução límpida de cor amarelo forte.

Introduziu-se, então, uma etapa de ultrafiltração, na qual utilizou-se uma célula de ultrafiltração(modelo 8050, AMICON®), e a membrana de celulose modelo YM-10 que faz corte para moléculas acima de 10 kDa . Durante a ultrafiltração era repostado o volume perdido, utilizando-se o tampão, de tal forma que o volume coletado fosse cerca de cinco vezes o volume inicial da amostra. Com este caldo obtido foi possível realizar os primeiros ensaios de adsorção em coluna cromatográfica utilizando-se tanto um leito fixo de resina como um leito expandido.

Com o material preparado dessa forma foi possível obter-se, também, isotermas de adsorção, curvas cinéticas de adsorção, e dados de adsorção em coluna cromatográfica.

Devido ao fato de ocorrer "roll-up"(JAMES, 1994) na adsorção em coluna cromatográfica, tentou-se outra forma de preparo de soluções contendo a enzima β -Galactosidase. Dissolveu-se o material liofilizado em tampão acetato, precipitou-se os insolúveis e centrifugou-se, como no preparo anteriormente descrito. O caldo obtido foi submetido à precipitação com acetona(proporção de 1:1). O precipitado foi centrifugado, e os sólidos coletados foram liofilizados.

O liofilizado foi dissolvido em tampão Tris-HCl(30 mM, pH 7,5), e os insolúveis removidos por centrifugação. Com o material preparado dessa forma foi possível obter-se isotermas de adsorção, curvas cinéticas de adsorção, e dados de adsorção em coluna cromatográfica.

Ainda, com este material liofilizado após a precipitação com acetona, preparou-se soluções(tampão Tris-HCl, 30 mM, pH 7,5) que foram submetidas a ultrafiltração. Durante a ultrafiltração era repostado o volume perdido, utilizando-se o mesmo tampão, de tal forma que o volume coletado fosse cerca de três vezes o volume da amostra

inicialmente colocada na célula de ultrafiltração. Com o material preparado dessa forma foi possível obter-se isotermas de adsorção, curvas cinéticas de adsorção, e dados de adsorção em coluna cromatográfica.

Uma outra forma de preparo de soluções foi realizada a partir do material liofilizado proveniente da precipitação com acetona. Após a dissolução em tampão Tris-HCl e centrifugação para a remoção de insolúveis, fez-se a operação de diálise em saco de membrana de celulose(corte para moléculas maiores que 10 kDa). Utilizou-se externamente o mesmo tampão, o qual foi trocado quatro vezes num período de 48 horas. O dialisado foi submetido, ainda, à operação de ultrafiltração utilizando-se a membrana YM-10. A solução obtida foi utilizada para adsorção em coluna cromatográfica.

Durante o preparo de soluções contendo a enzima determinou-se a presença de polifenóis em soluções contendo a enzima através do método desenvolvido por PRICE e BUTTLER(1977).

3.5. Isoterma de Adsorção de β -Galactosidase

As Isotermas de adsorção em resina trocadora de íons, tanto de atividade da β -Galactosidase como de proteína total em solução, foram obtidas através de ensaios do tipo batelada, para as condições de adsorção selecionadas(tampão, pH e força iônica). Uma mesma massa(aproximadamente 50 mg) da resina Accell[®] Plus QMA foi colocada em colunas de plástico usadas para filtração(3 mL de capacidade); as colunas era m equipadas com um filtro para manter a resina. A resina, uma vez colocada na coluna, foi equilibrada com tampão Tris-HCl 30 mM, pH 7,5. As colunas foram mantidas sob agitação no equipamento mostrado na Figura 3.1, o qual simula um tanque agitado.

Após o condicionamento da resina removeu-se o tampão de condicionamento, e, então, adicionou-se, a cada coluna com resina, 1 mL de solução contendo uma quantidade inicial conhecida tanto de atividade da enzima como de proteína total. Para cada coluna a

quantidade de atividade inicial em solução era diferente, para que fosse possível obter concentrações finais diferentes no equilíbrio. As colunas foram mantidas sob agitação (Figura 3.1) à temperatura ambiente (em torno de 25°C) até que o equilíbrio fosse atingido.

Estudos preliminares mostraram que um período de 2 horas era suficiente para atingir o equilíbrio. Após o equilíbrio foram determinadas tanto a atividade da enzima como a concentração de proteína total no líquido sobrenadante. Pela diferença de concentração, quer seja de atividade quer seja de proteína, pode-se construir a isoterma de equilíbrio, expressando-se a capacidade do adsorvente, Γ^* (mg de proteína por grama da resina, ou ainda unidades de atividade da enzima por grama da resina) versus concentração no líquido, C^* (mg de proteína por mL de solução, ou unidades de atividade por mL de solução). O modelo de Langmuir (LANGMUIR, 1916) foi ajustado aos dados de Γ^* versus C^* , através de um programa computacional para regressão não linear, o qual utiliza o método simplex.

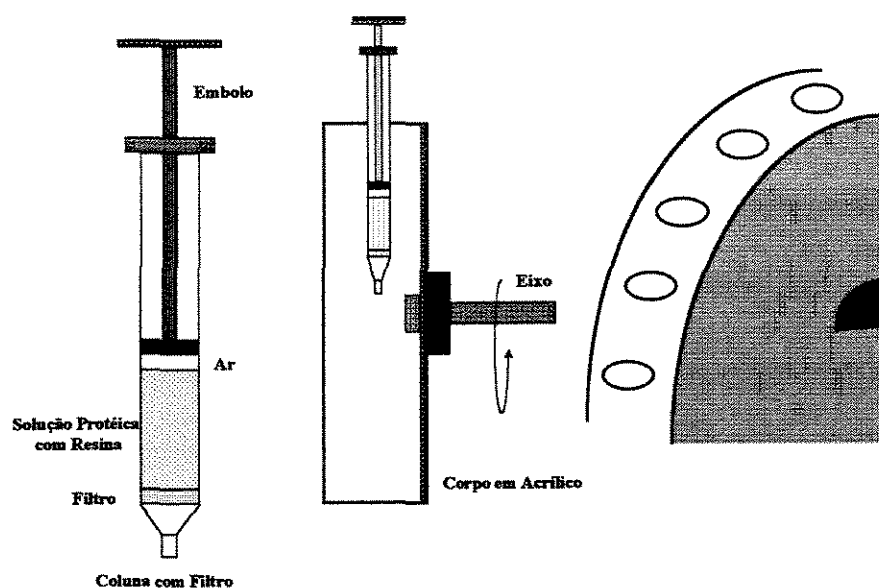


Figura 3.1 - Dispositivos usados para simular um tanque agitado.

3.6. Cinética de Adsorção em Tanque Agitado

Curvas cinéticas de adsorção em resina trocadora de íons, tanto de atividade da β -Galactosidase como de proteína total em solução, foram obtidas através de ensaios do tipo batelada. Utilizou-se as mesmas condições em que foram obtidas as isotermas de adsorção na resina Accell[®] Plus QMA, inclusive a forma de condicionamento da mesma.

Após o condicionamento da resina, adicionou-se a cada coluna 1 mL de solução contendo uma quantidade inicial conhecida tanto de atividade da enzima como de proteína total. As colunas com filtro foram mantidas sob agitação(Figura 3.1) à temperatura ambiente(em torno de 25°C), por um período de tempo diferente uma das outras. Dessa forma, foi possível obter-se, para diferentes intervalos de tempo, as concentrações de atividade da enzima e de proteína total para a construção de uma curva cinética.

3.7. Adsorção em Coluna Cromatográfica

O primeiro ensaio de adsorção em coluna cromatográfica, utilizando-se a resina Accel Plus QMA em leitos fixo e expandido, foi realizado num equipamento do tipo FPLC("fast protein liquid chromatography"), marca BIO-RAD[®] (Biologic Workstation). Este equipamento permite a elaboração de um protocolo, o qual é executado automaticamente pela estação de trabalho.

Os demais ensaios de adsorção em coluna cromatográfica foram realizados num FPLC[®]("fast protein liquid chromatography") Pharmacia[®], equipado com o controlador modelo LCC-501, "superloop"(reservatório) de 150 mL para injeção de grandes volumes, e coletor de frações modelo FRAC-200(Figura 3.2). Este equipamento permite a elaboração de um protocolo de cromatografia frontal, o qual é executado pelo controlador. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo para a construção das curvas de adsorção e de eluição.

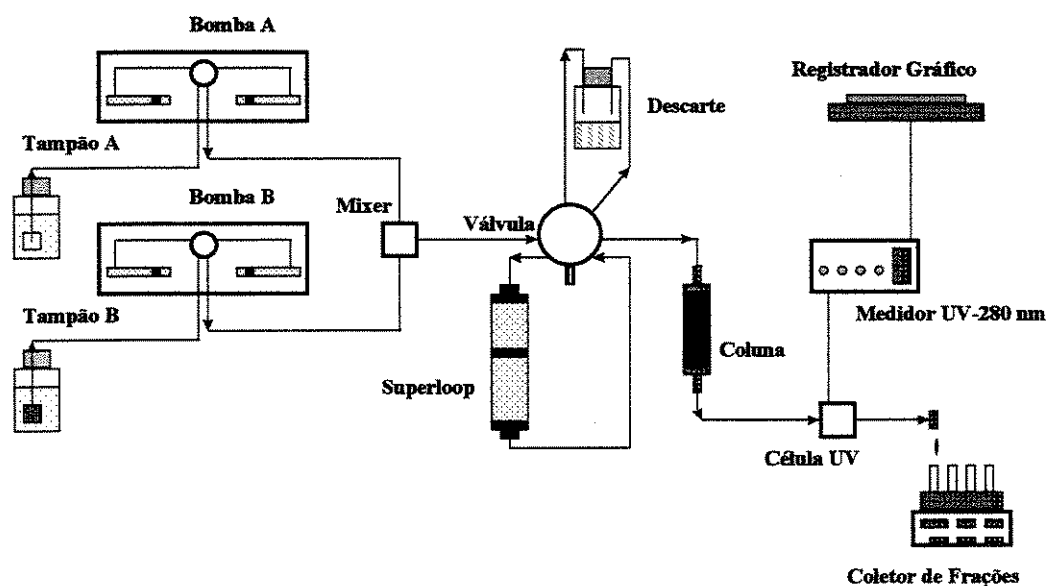


Figura 3.2 - Esquema básico do FPLC utilizado.

3.8. Filtração em Gel

As frações do pico característico de concentração da enzima, coletadas na saída da coluna cromatográfica de troca iônica, foram agrupadas, e submetidas à filtração em gel, para a purificação final da enzima. Foi escolhido o gel Superose 6, que tem limite de exclusão para o peso molecular de 80kDa ; a β -Galactosidase do *Scopulariopsis sp* tem peso molecular de aproximadamente 95 kDa(PASTORE, 1982). Utilizou-se também o FPLC® Pharmacia®, esquematizado na Figura 3.2, para a filtração em gel.

3.9. Eletroforese SDS-PAGE em Gel de Poliacrilamida

Fez-se determinação de peso molecular de proteínas presentes em solução contendo β -Galactosidase, antes da utilização em testes de adsorção em coluna

cromatográfica, bem como de algumas frações coletadas durante a eluição das proteínas que estavam adsorvidas na resina.

As proteínas foram desnaturadas com a adição de dodecil sulfato de sódio, β -mecaptoetanol, e aquecimento à fervura(PHARMACIA BIOTECH, 1998). As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com o protocolo descrito em LAEMMLI, 1970 e BIO-RAD, 1998. As etapas de fixação e revelação com Coomassie Blue foram realizadas de acordo com o procedimento descrito PHARMACIA BIOTECH, 1994. A fixação e revelação utilizando-se nitrato de prata foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por MORRISSEY, 1981. Utilizou-se a célula de eletroforese Mini-Protean[®] II da Bio-Rad[®].

3.10. Porosidade do Leito e da Partícula do Adsorvente

Para a determinação da porosidade da partícula de adsorvente Accel[®] Plus QMA, utilizou-se o sistema mostrado na Figura 3.3. Utilizou-se o tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 com 1 M de NaCl, e os traçadores acetona(1%) e dextrana-blue de peso molecular 2000 kDa(0,2%).

Após a montagem do sistema mostrado na Figura 3.3, mantendo-se os adaptadores móveis encostados(sem o leito de resina), e com o sistema de aquisição de dados e espectrofotômetro operacionais, injetou-se 200 μ L do traçador acetona 1% , para uma determinada vazão volumétrica $Q(\text{mL.min}^{-1})$. Coletou-se o sinal $V(\text{mV})$ de saída no espectrofotômetro. O sinal correspondente a absorbância medida no comprimento de onda $\lambda=265$ nm. Repetiu-se esta operação para um total de 5 vazões volumétricas. O mesmo procedimento foi executado com o traçador dextrana-blue, para as mesmas vazões volumétricas. A mesma coluna usada anteriormente foi empacotada com a resina Accell[®] Plus QMA, formando-se um leito de altura $h(\text{cm})$. Condicionou-se a resina no tampão Tris-HCl com 1M de NaCl. Com o sistema de dados e espectrofotômetro operacionais,

executou-se o mesmo procedimento anterior para os dois traçadores. As vazões volumétricas utilizadas também foram as mesmas.

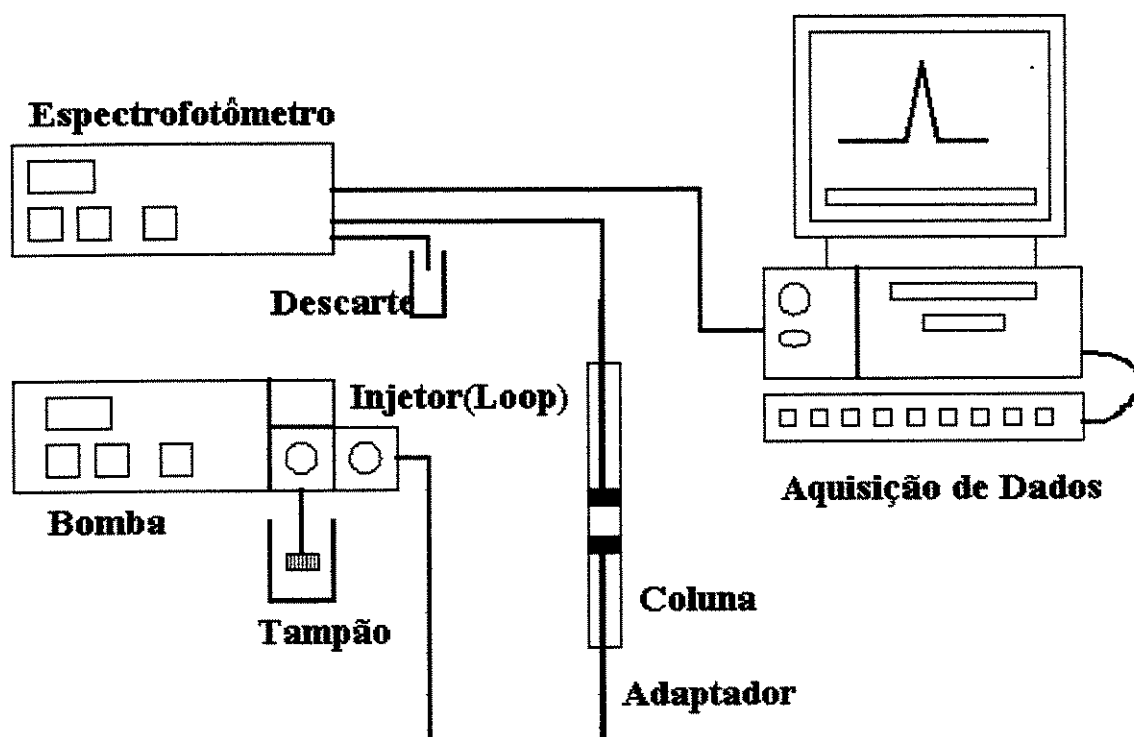


Figura 3.3 - Dispositivo utilizado para obtenção de dados relativos à técnica dos momentos.

As absorvâncias medidas são proporcionais à concentração para valores menores que a injetada. Dessa forma, o primeiro momento foi calculado pela expressão:

$$M_{0_1}^v = \frac{\int_0^{\infty} tC(t)dt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i}{\sum_{i=1}^n C_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i (\Omega V_i)}{\sum_{i=1}^n (\Omega V_i)} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i V_i}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad (3.17)$$

em que $M_{0_1}^v$ é o primeiro momento para o sistema sem a resina (coluna vazia com os dois adaptadores móveis encostados), t_i (min) é o tempo em que mediu-se $C(t)$, a concentração de traçador na saída da coluna, Ω é a constante de proporcionalidade entre concentração do traçador e o valor do sinal V_i (mV) medido no espectrofotômetro no tempo t_i . Não há

necessidade de construir-se uma curva de calibração relacionando absorbância do traçador versus a concentração do mesmo; basta utilizar-se a tensão medida.

O primeiro momento para o sistema, $M_{0,1}^s$, quando a coluna está empacotada com a resina, foi calculado pela expressão:

$$M_{0,1}^s = \frac{\int_0^\infty tC(t)dt}{\int_0^\infty C(t)dt} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i C_i}{\sum_{i=1}^n C_i} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i (\Omega V_i)}{\sum_{i=1}^n (\Omega V_i)} = \frac{\sum_{i=1}^n t_i V_i}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad (3.18)$$

O primeiro momento para o leito, $M_{0,1}^L$, foi calculado fazendo-se a diferença entre os primeiro momento do sistema completo, $M_{0,1}^s$, e aquele sem a resina, $M_{0,1}^v$. De acordo com ARNOLD et al., 1985, FURUSAWA et al., 1976, o primeiro momento é calculado pela expressão:

$$M_{0,1}^L = M_{0,1}^s - M_{0,1}^v - \frac{t_0}{2} = \frac{h}{v_s} [\varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e)\varepsilon_i] \quad (3.19)$$

Determinou-se a porosidade do leito de resina utilizando-se os dados obtidos com o traçador de alto peso molecular, dextrana-blue, visto que esta molécula não pode penetrar nos poros da partícula de resina. Neste caso a porosidade da partícula é tomada virtualmente como sendo $\varepsilon_i=0$, e a expressão para o primeiro momento do leito fica:

$$M_{0,1}^L = M_{0,1}^s - M_{0,1}^v - \frac{t_0}{2} = \frac{h}{v_s} \varepsilon_e \quad (3.20)$$

que é a equação de uma reta com inclinação ε_e , e que representa a própria porosidade do leito de resina.

A porosidade da partícula foi obtida com a utilização dos dados do traçador acetona, visto que este pode penetrar nos poros da partícula. O valor de $[\varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e)\varepsilon_i]$ corresponde a inclinação da reta obtida no gráfico de $M_{0,1}^L$ versus h/v_s .

3.11. Solução do Modelo de Adsorção em Tanque Agitado

O modelo de adsorção em tanque agitados, equações 2.20 e 2.21, juntamente com as respectivas condições iniciais (equações 2.12 e 2.22) e condições de contorno (equações 2.13 e 2.14), foram reduzidas a um sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, usando-se o método de colocação ortogonal conforme FINLAYSON (1980), VILLADSEN e MICHELSEN (1978), e YAO e TIEN (1992), NEVES (1995).

De forma simplificada, a aplicação do método da colocação ortogonal envolve a escolha de um polinômio ortogonal para o qual são calculadas as raízes z_i e as matrizes de discretização A_{ij} e B_{ij} . A solução obtida para o sistema corresponde apenas a pontos discretos ao longo da dimensão radial da partícula de adsorvente, pontos estes que são definidos pelas raízes do polinômio ortogonal. O polinômio ortogonal usado foi o de Jacobi, cuja expressão geral é descrita em VILLADSEN e MICHELSEN (1978),

$$(1-x)^{\alpha} x^{\beta} P_n^{(\alpha, \beta)}(x) = \frac{(-1)^n \Gamma(\beta+1)}{\Gamma(n+\beta+1)} \frac{d^n [(1-x)^{n+\alpha} x^{n+\beta}]}{dx^n} \quad (3.21)$$

em que o índice n corresponde ao grau do polinômio, $\Gamma(n)$ à função gama, e α e β aos parâmetros da função peso definida pela equação:

$$W(x) = x^{\beta} (1-x)^{\alpha} \quad (3.22)$$

Dessa forma, para cada par de parâmetros (α, β) escolhido, corresponde uma série de polinômios ortogonais denotada por $P_n^{(\alpha, \beta)}(x)$.

A solução deste sistema de equações diferenciais e algébricas foi resolvido simultaneamente, utilizando-se o método BDF (Backward Differentiation Formulas, Implicit Differential Systems), PETZOLD (1982), PETZOLD (1983), BRENAN (1996), implementado na rotina DASSL (A Differential/Algebraic System Solver, de domínio público), desenvolvida por PETZOLD (1982). Os valores ótimos dos coeficientes k_f e D_{ef} para as curvas cinéticas, foram obtidos pela aplicação do método de otimização não-linear

multivariável proposto por BOX(1965). Essas duas rotinas foram implementadas num programa computacional em linguagem Fortran.

3.12. Solução do Modelo de Adsorção em Coluna Cromatográfica

O modelo de adsorção em coluna cromatográfica, equações 2.23(fase líquida externa) e 2.28(fase sólida), juntamente com as respectivas condições iniciais(equações 2.26 e 2.30) e condições de contorno(equações 2.25 e 2.26), foram reduzidas a um sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, usando-se o método de colocação ortogonal conforme FINLAYSON(1980), VILLADSEN e MICHELSEN(1978), NEVES(1995). O polinômio ortogonal usado foi o de Jacobi, como descrito anteriormente.

A solução deste sistema de equações diferenciais e algébricas foi resolvido simultaneamente, utilizando-se o método BDF(Backward Differentiation Formulas, Implicit Differential Systems), PETZOLD(1982), PETZOLD(1983), BRENAN(1996), implementado na rotina DASSL(A Differential/Algebraic System Solver, de domínio público), desenvolvida por PETZOLD(1982). Os valores ótimos dos coeficientes k_L e D_a , para as curvas de ruptura("breakthrough"), foram obtidos pela aplicação do método de otimização não-linear multivariável proposto por BOX(1965). Essas duas rotinas foram implementadas num programa computacional em linguagem Fortran.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Porosidade da Resina Accell® Plus QMA

Determinou-se a porosidade das partículas e de um leito de resina Accell Plus QMA através do método dos momentos. Utilizou-se uma coluna Pharmacia® modelo HR 5/2(5mm de diâmetro), com um leito de resina de altura $h=3,3$ cm, e vazões volumétricas na faixa de $Q=0,25$ a $2,0$ mL.min⁻¹. O sinal V (mV) coletado no espectrofotômetro, quando injetou-se o traçador, com a coluna está vazia e com o leito, é apresentado na Figura 4.1, juntamente com os respectivos tempos de retenção calculados. Como era esperado, o tempo de retenção($t_R=72,7$ s) para a coluna com o leito de resina foi maior que o obtido quando a coluna estava vazia($t_R=40,2$ s).

Na Figura 4.2 estão plotados os dados experimentais obtidos para os primeiros momentos relativos ao leito de resina, para os dois traçadores, bem como a equação da reta ajustada aos dados experimentais.

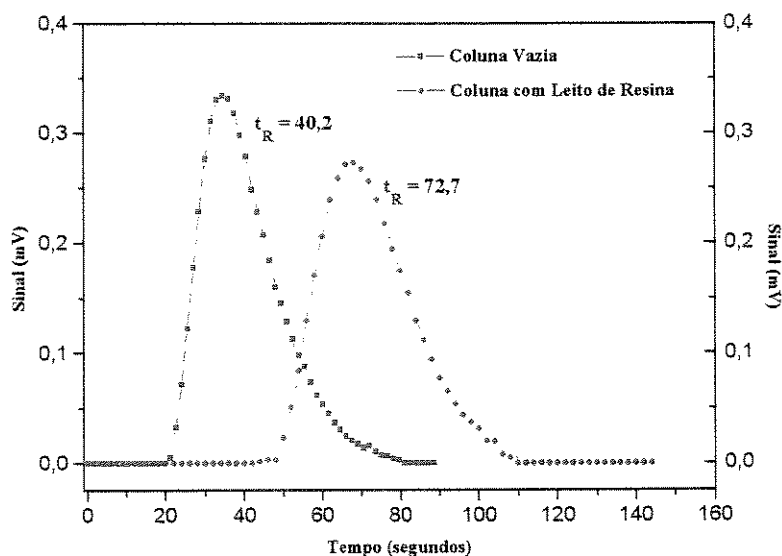


Figura 4.1 - Sinal(mV) coletado em função do tempo(s), com a coluna vazia e com o leito de resina $h=3,3$ cm, usando-se o traçador acetona, e vazão volumétrica $Q=1,0$ mL.min⁻¹.

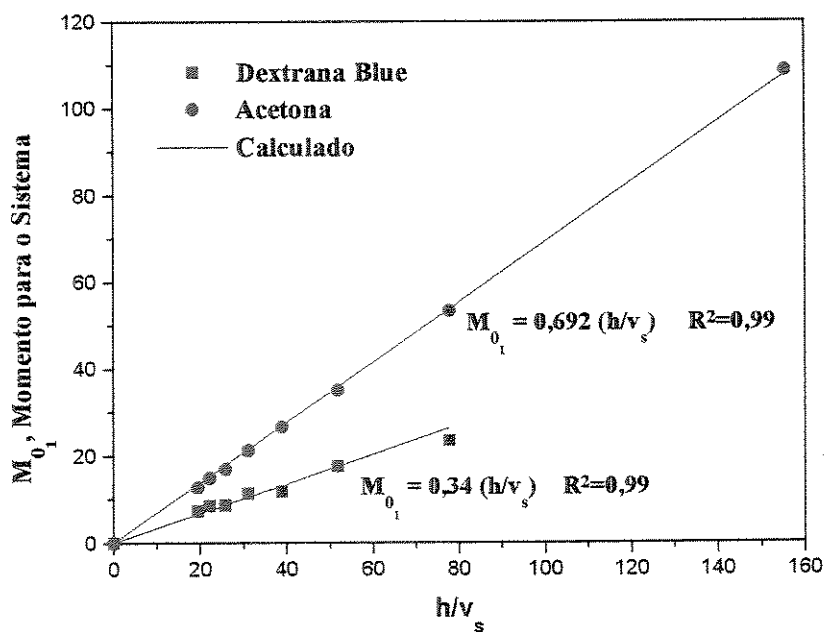


Figura 4.2 - Dados experimentais e calculados para os momentos do leito de resina, utilizando-se os traçadores acetona e dextrana blue.

A equação da reta ajustada ao dados experimentais de momentos para o leito, usando o traçador dextrana blue, é:

$$M_{0_i} = 0,337 \frac{h}{v_s} \quad (4.1)$$

em que a inclinação representa a própria porosidade do leito de resina, $\varepsilon_e=0,337$.

Para o traçador acetona, a equação da reta ajustada aos dados experimentais é:

$$M_{0_i} = 0,692 \frac{h}{v_s} \quad (4.2)$$

em que a inclinação(0,692) é igual a $[\varepsilon_e + (1-\varepsilon_e)\varepsilon_i]$. Visto que o valor obtido para a porosidade do leito é $\varepsilon_e = 0,337$, então calcula-se $\varepsilon_i = 0,535$, que representa a porosidade da partícula de adsorvente.

4.2. Estudo da Expansão do Leito de Accell® Plus QMA

Fez-se um estudo de expansão de um leito de resina Accell Plus QMA, utilizando-se uma coluna Pharmacia® modelo C 10/20 (10 mm de diâmetro), leito de altura inicial $h=2,6$ cm, e vazões volumétricas de $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ até $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. O tampão utilizado foi o Tris-HCl (30 mM, pH 7,5). Na Figura 4.3 estão traçados os dados experimentais obtidos na expansão, juntamente com o modelo linear ajustado aos mesmos.

Verifica-se no gráfico representado na Figura 4.3, que a altura do leito de resina varia linearmente com a velocidade superficial da fase de líquido. Para o valor máximo de velocidade superficial utilizada($1,27 \text{ cm.min}^{-1}$), que corresponde a uma vazão volumétrica de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, houve uma expansão do leito em 3,1 vezes em relação à altura inicial($h=2,6\text{cm}$).

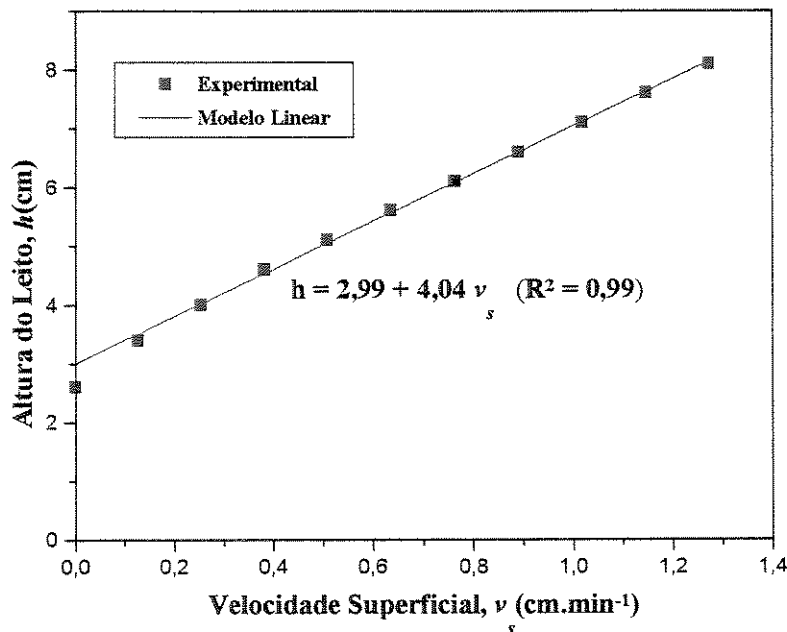


Figura 4.3 - Curva de expansão da resina Accell Plus QMA.

Com base na teoria de fluidização (KUNII e LEVENSPIEL, 1977), a porosidade do leito expandido pode ser calculada utilizando-se a porosidade do leito (anteriormente determinada pelo método dos momentos) e os dados de expansão do leito (Figura 4.3), através da expressão

$$h_1(1 - \varepsilon_1) = h_0(1 - \varepsilon_0) \quad (4.3)$$

em que o subscrito 0 indica a condição inicial para a altura e porosidade do leito (fixo), enquanto o subscrito sub 1 indica as mesmas variáveis para o leito após a expansão.

4.3. A Enzima β -Galactosidase Produzida

A enzima β -Galactosidase foi produzida conforme o protocolo descrito no Material e Métodos. O material obtido após a liofilização apresenta cor variando de cinza para marrom escuro. A quantidade produzida em cada lote variou de 3 a 12 gramas de extrato bruto liofilizado. Após a dissolução em tampão observava-se partículas de

varredura no espectrofotômetro (comprimentos de onda na faixa de $\lambda=340$ nm até 600 nm), que o ONP tem um pico de absorbância na faixa de 405 a 420 nm.

Construiu-se uma curva de calibração de absorbância do ONP ($\lambda=420$) *versus* concentração do mesmo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A equação da reta que passa pela origem tem inclinação igual ao coeficiente de extinção, e o valor obtido foi $4,35 \text{ cm}^2.\mu\text{mol}^{-1}$. Na literatura encontrou-se valores tais com $4,5 \text{ cm}^2.\mu\text{mol}^{-1}$ (MCPHERSON e KHACHATOURIANS, 1991) e $3,1 \text{ cm}^2.\mu\text{mol}^{-1}$ (PISANI et al., 1990).

O volume total de um ensaio de atividade da β -Galactosidase era $V_T = 2000 \mu\text{L}$. Este volume era composto de um volume de amostra (V_A) de solução contendo a enzima, um volume de tampão acetato para completar o volume da amostra para $1700 \mu\text{L}$, $150 \mu\text{L}$ de solução de ONPG a 0,25% em tampão acetato 100 mM pH 5,0,. Após a incubação a 60°C por um período de tempo $t=15$ minutos, a reação era interrompida com $150 \mu\text{L}$ de solução de Na_2CO_3 a 10% ($\cong 1\text{M}$). A absorbância da solução do ensaio era lida a ($\lambda=420$ nm). A atividade enzimática era calculada através da expressão:

$$U = \frac{2000}{V_A} \frac{Abs^{420}}{4,35} \frac{1}{15} \frac{f_d}{L} \quad (4.4)$$

em que U é a quantidade de unidades de atividade por unidade de volume, L é o comprimento do caminho ótico da cubeta utilizada no espectrofotômetro ($L=1 \text{ cm}$), e f_d é um fator de diluição da amostra, caso tenha ocorrido.

Construiu-se um gráfico de absorbância a 420 nm *versus* concentração de enzima utilizada no ensaio de atividade enzimática. Verificou-se que, para a quantidade de substrato ONPG utilizado no ensaio, até o valor de 1,5 unidades de absorbância, os dados são representados pela equação da reta que passa pela origem. Portanto, ensaios com valores de absorbância lida acima de 1,5 eram repetidos com volumes menores de amostra da solução contendo a enzima, ou fazia-se diluições da amostra.

4.5. Ensaios Preliminares de Adsorção

Fez-se, inicialmente, tentativas de adsorção em batelada da enzima presente em soluções preparadas com o extrato bruto produzido. O extrato bruto era dissolvido em tampão Tris-HCl(30mM, pH 7,5), a suspensão submetida a centrifugação, e o sobrenadante recolhido era utilizado nos ensaios. Utilizou-se massas de resina variando de 20 a 100 mg, para volumes de 1,5 mL de solução contendo atividade em torno de 5 U.mL⁻¹. Verificava-se que a quantidade de atividade adsorvida por unidade de massa da resina era muito pequena.

As primeiras tentativas de adsorção em leito fixo, também apresentavam um comportamento diferente do normalmente esperado. Após a injeção de 10 a 12 mL de solução(contendo em torno de 1 U.mL⁻¹) já era observada a saída de β -Galactosidase da coluna, numa quantidade(medida através de atividade) próxima àquela da solução da alimentação; subseqüentemente toda a enzima injetada saía da coluna.

Introduziu-se, então, uma etapa de ultrafiltração após a centrifugação, para preparar soluções destinadas aos ensaios de adsorção. Utilizou-se uma membrana com corte para moléculas maiores que 10 kDa. Dessa forma, observou-se em ensaios tipo batelada que havia adsorção da enzima em quantidade apreciável.

4.6. Adsorção e Eluição em Leito Fixo e Expandido

No preparo de soluções contendo a enzima β -Galactosidase(tampão Tris-HCl 30 mM, pH 7,5), tanto para a adsorção em leito fixo como para aquela em leito expandido, foi utilizada a ultrafiltração em membrana com corte para moléculas de 10 kDa. A atividade específica da enzima em solução foi 25,2 U.mg⁻¹ para a solução usada na adsorção em leito fixo, e 17,2 U.mg⁻¹ para o ensaio de adsorção em leito expandido. Na etapa de adsorção, para os dois tipos de ensaios, injetou-se na coluna um volume igual

a 144 mL de solução contendo a enzima.

A vazão volumétrica utilizada foi 1 mL.min⁻¹, correspondente a velocidade superficial de 1,27 cm.min⁻¹, para ambos os ensaios de adsorção. No ensaio de adsorção em leito expandido a altura inicial do leito era 2,6 cm (1 g de resina), o que significa que a altura do leito inicial era 8,1 cm, conforme o estudo representado na Figura 4.3. No ensaio em leito fixo também foi utilizado 1 g de resina.

Durante a execução do ensaio de adsorção em leito expandido a altura do leito não se mantém, diminuindo com o tempo, o que exige o reposicionamento do pistão(adaptador) superior, para mante-lo a cerca de 1 mm de distância em relação ao leito expandido.

Fez-se a etapa de lavagem da resina após a adsorção utilizando-se o mesmo tampão de preparo da solução contendo a enzima. O leito expandido foi colocado na condição de leito fixo para esta etapa e para a subsequente.

Na eluição das proteínas adsorvidas na resina utilizou-se o tampão Tris-HCl(30 mM, pH 7,5), tampão A, e este mesmo tampão contendo 1 M de NaCl, tampão B. Com o uso das duas bombas do FPLC fez-se um gradiente linear de NaCl, partindo-se do tampão A até atingir a condição em que injetava-se somente o tampão B.

Nas Figuras 4.5 e 4.6 mostra-se os cromatogramas de adsorção, de lavagem da resina, e de eluição de β -Galactosidase em leito fixo e leito expandido de Accell Plus QMA, respectivamente.

A quantidade de atividade da enzima e de proteína total injetados não foi suficiente para produzir-se uma curva de ruptura("breakthrough"). Nos ensaios de adsorção em leito fixo e expandido, após a eluição, reuniu-se as frações coletadas referente ao pico. Na adsorção em leito fixo o rendimento obtido foi de 92,4%, e para o leito expandido foi 83%.

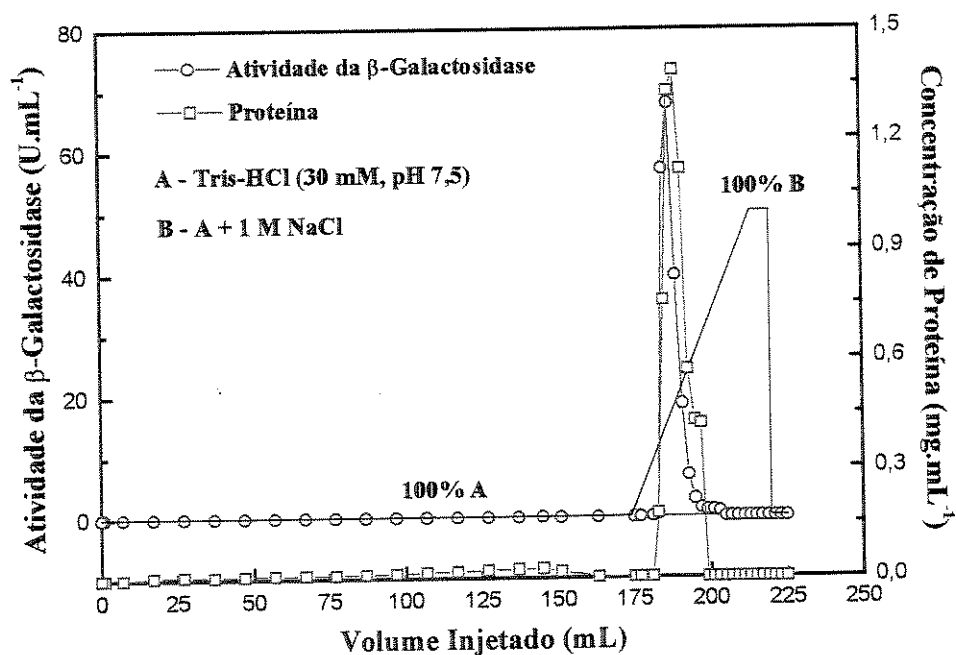


Figura 4.5 - Adsorção e eluição em leito fixo.

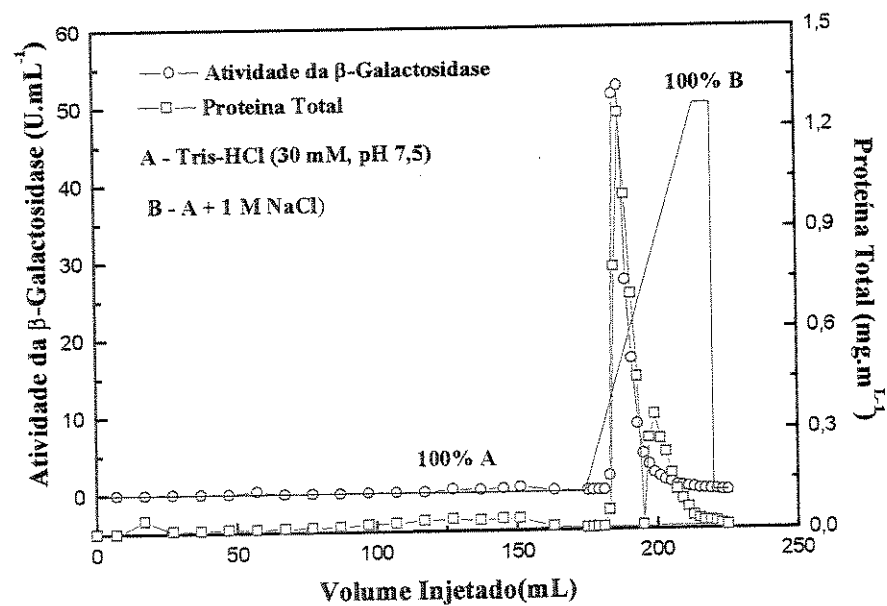


Figura 4.6 - Adsorção e eluição em leito expandido.

O fator de purificação obtido para os processos de adsorção em leito fixo e leito expandido foram 3,2 e 2,2 respectivamente. Na Tabela 4.1 apresenta-se os resultados obtidos nos ensaios em termos de fator de purificação e de rendimento.

Tabela 4.1 - Resumo dos Ensaio de Adsorção em Leito Fixo e Expandido

Tipo De Leito		Volume (mL)	AE* (U.mg ⁻¹)	Fator de Purificação	Atividade Total	Rendimento %
Fixo	Início	144,0	25,2	1,0	396	100,0
	Final	8,0	79,6	3,3	366	92,4
Expandido	Início	144,0	17,2	1,0	400	100,0
	Final	14,0	37,3	2,2	333	83,0

* - Atividade Específica; unidades de atividade por mg de proteína.

4.7. Ensaio de Adsorção com Solução Ultrafiltrada

4.7.1. Isotermas de Adsorção de Proteína e de Atividade

Nas Figuras 4.7 e 4.8 são apresentadas as isotermas de adsorção de proteína e de atividade da β -Galactosidase, respectivamente. As soluções contendo β -Galactosidase, que foram utilizadas nos ensaios, foram preparadas com a utilização de uma etapa de ultrafiltração em membrana com poros para corte de moléculas maiores que 10 kDa.

O comportamento da isoterma de adsorção de proteína total(Figura 4.7) é similar ao obtido em situações em que há apenas uma única espécie química de proteína presente em solução(FIROUZTALE, 1992; HORSTMAM e CHASE, 1989), e também no caso em que há mais de uma espécie química(CARRÈRE, 1993; PAPAMICHAEL e HUSTEDT, 1993).

Por outro lado, o comportamento dos dados da isoterma de adsorção de β -Galactosidase(atividade da enzima) é sigmoidal(Figura 4.8); para valores maiores de

atividade no equilíbrio observa-se uma menor quantidade de enzima adsorvida por unidade de massa da resina trocadora de íons. Este tipo de comportamento sigmoidal foi observado (BRASH, 1987) no caso da adsorção de fibrinogênio do plasma sanguíneo em cinco tipos de superfícies.

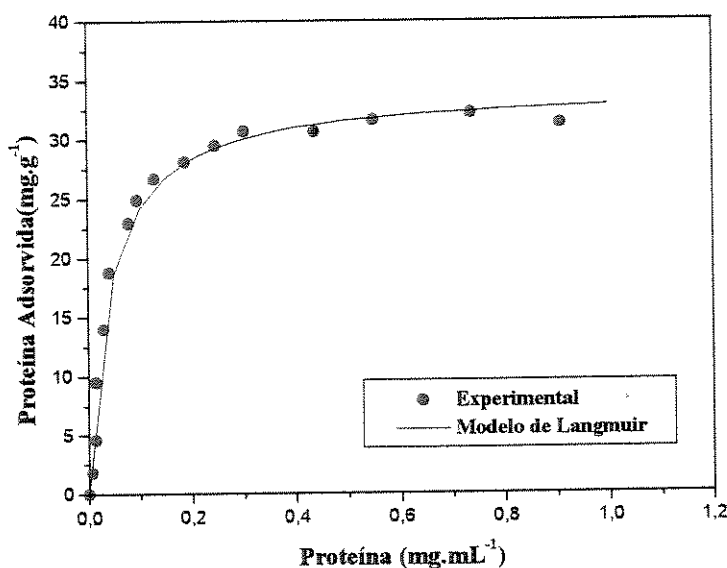


Figura 4.7 - Isoterma de adsorção de proteína - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5- solução preparada com etapa de ultrafiltração.

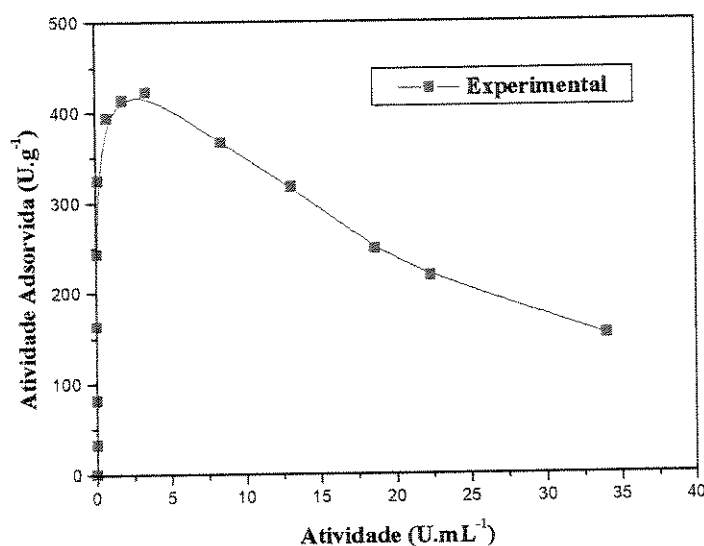


Figura 4.8 - Isoterma de adsorção de atividade da β -Galactosidase - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 - solução preparada com etapa de ultrafiltração.

O comportamento dos dados experimentais de adsorção de atividade, mostrados na Figura 4.8, sugerem que há competição entre as espécies químicas presentes em solução pelos sítios de adsorção na resina. Deve-se lembrar que sem a operação de ultrafiltração, em que foram removidas parcialmente as moléculas menores que 10 kDa, não havia adsorção apreciável quer de atividade quer de proteínas. Comparando-se as duas isotermas, salienta-se o fato daquela referente à adsorção de proteínas ter o mesmo comportamento de isotermas de adsorção de proteínas puras. Portanto, pode-se supor que sejam essas moléculas de tamanho menor que 10 kDa, tais como polifenóis e outras proteínas, ou ainda peptídios de baixo peso molecular, os quais possuem carga, que competem pelos sítios de ligação na resina.

Na Figura 4.9 plotou-se somente uma parte dos dados da isoterma de adsorção de atividade mostrados na Figura 4.8. Esses dados são referentes a concentrações de equilíbrio menores que 3,5 U.mL⁻¹.

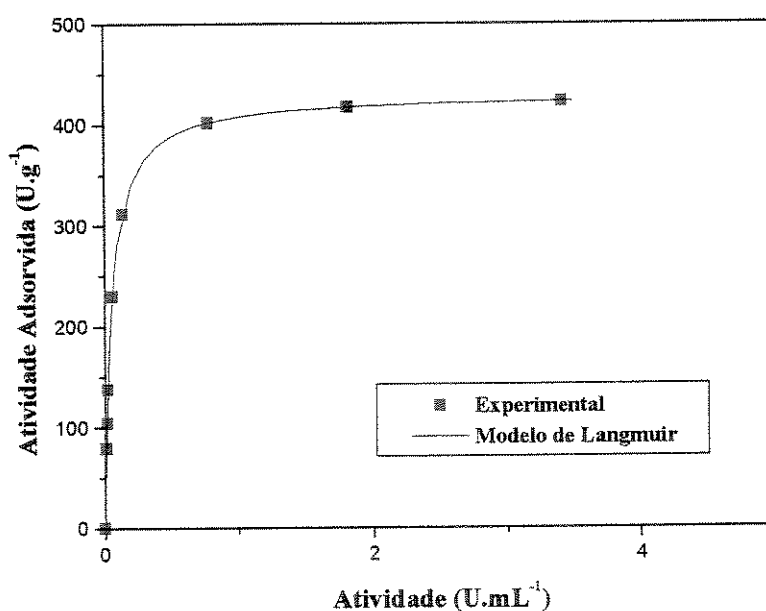


Figura 4.9 - Isotherma de adsorção de atividade da β -Galactosidase. Dados explicados pelo modelo de Langmuir. Tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; - solução preparada com etapa de ultrafiltração.

Verifica-se, na Figura 4.9, que para valores de concentrações de atividade inferiores a 3,5 U.mL⁻¹, o comportamento dos dados experimentais de adsorção é similar àquele obtido para adsorção de proteínas(Figura 4.8).

Uma avaliação quantitativa dos resultados experimentais mostrados na Figura 4.8 foi efetuada pelo ajuste do modelo de isoterma proposto por Langmuir(LANGMUIR, 1916),

$$\Gamma^* = \frac{\Gamma_m C^*}{k_d + C^*} \quad (4.5)$$

em que $\Gamma^*(\text{mg.g}^{-1})$ é a massa de proteína adsorvida na resina, $C^*(\text{mg.mL}^{-1})$ é a concentração de proteína em solução, $\Gamma_m(\text{mg.g}^{-1})$ é a capacidade máxima da resina, e $k_d(\text{mg.mL}^{-1})$ é a constante de dissociação. Neste caso, o modelo explica bem os dados experimentais($\Gamma_m = 34,21 \text{ mg.g}^{-1}$; $k_d = 0,04176 \text{ mg.mL}^{-1}$; $R^2 = 0,99$), visto que o coeficiente de determinação é elevado. O resultado do ajuste está representado na própria Figura 4.7.

O valor da capacidade máxima, $\Gamma_m = 34,21 \text{ mg.g}^{-1}$, obtida neste caso, é muito menor que aquela obtida em ensaios de adsorção de proteínas puras tais como BSA(ARAÚJO, 1996)($\Gamma_m = 302,7 \text{ mg.g}^{-1}$; $k_d = 0,0051 \text{ mg.mL}^{-1}$), Insulina(CRUZ, 1997)($\Gamma_m = 330,8 \text{ mg.g}^{-1}$; $k_d = 0,0748 \text{ mg.mL}^{-1}$) utilizando-se a mesma resina(Accell Plus QMA). Somente o valor de $k_d = 0,04176 \text{ mg.mL}^{-1}$ tem a mesma ordem de grandeza daquele obtido por CRUZ(1997)($k_d = 0,0748 \text{ mg.mL}^{-1}$).

O modelo de Langmuir, equação 5, adaptado para expressar unidades de atividade(U) no lugar de massa de proteína, ajusta-se bem aos dados experimentais mostrados na Figura 4.9($\Gamma_m = 429,2 \text{ U.g}^{-1}$; $k_d = 0,05312 \text{ U.mL}^{-1}$; $R^2 = 0,98$), como pode ser observado na própria Figura 4.9, bem como pelo elevado valor do coeficiente de determinação.

Na Tabela 4.2 apresenta-se um resumo dos valores dos parâmetros obtidos através do ajuste não linear, bem como os valores desses parâmetros quando expressa-se a capacidade da resina por unidade de volume da mesma.

Tabela 4.2 - Parâmetros do Modelo de Langmuir; solução preparada com uma etapa de ultrafiltração.

Isoterma de Adsorção de Proteína		Isoterma de Adsorção de Atividade	
Γ_m	34,21 mg.g ⁻¹	Γ_m	429,2 U.g ⁻¹
k_d	0,04176 mg.mL ⁻¹	k_d	0,05312 U.mL ⁻¹
$R^2 = 0,99$		$R^2 = 0,98$	
q_m	40,36 mg.mL ⁻¹	q_m	506,5 U.mL ⁻¹
k_d	0,04176 mg.mL ⁻¹	k_d	0,05312 U.mL ⁻¹

4.7.2. Curvas Cinéticas de Adsorção em Tanque Agitado

As curvas cinéticas obtidas para três valores iniciais de concentração de proteína e de atividade da enzima estão representadas nas Figuras 4.10 e 4.11, respectivamente. As soluções contendo β -Galactosidase também foram preparadas com o uso de uma etapa de ultrafiltração.

Observa-se nestas curvas que a concentração de proteína, e também de atividade, em solução no tanque agitado diminuem rapidamente nos primeiros instantes do processo de adsorção, e que após 10 minutos a variação da concentração é muito pequena. O mesmo comportamento de adsorção nos primeiros minutos também foi observado em curvas cinéticas de adsorção de BSA(ARAÚJO, 1996) e Insulina(CRUZ, 1997) utilizando a mesma resina(Accell Plus QMA); nestes casos referentes a proteínas puras dissolvidas em tampão.

Deve-se observar com atenção na Figura 4.11 a curva cinética de adsorção para a maior atividade inicial da enzima em solução(22,4 U.mL⁻¹). Nesta curva a atividade da enzima diminui para cerca de 60% do valor inicial, e permanece próximo a este valor, enquanto para os dois outros valores a concentração diminui pra cerca de 40% do valor inicial.

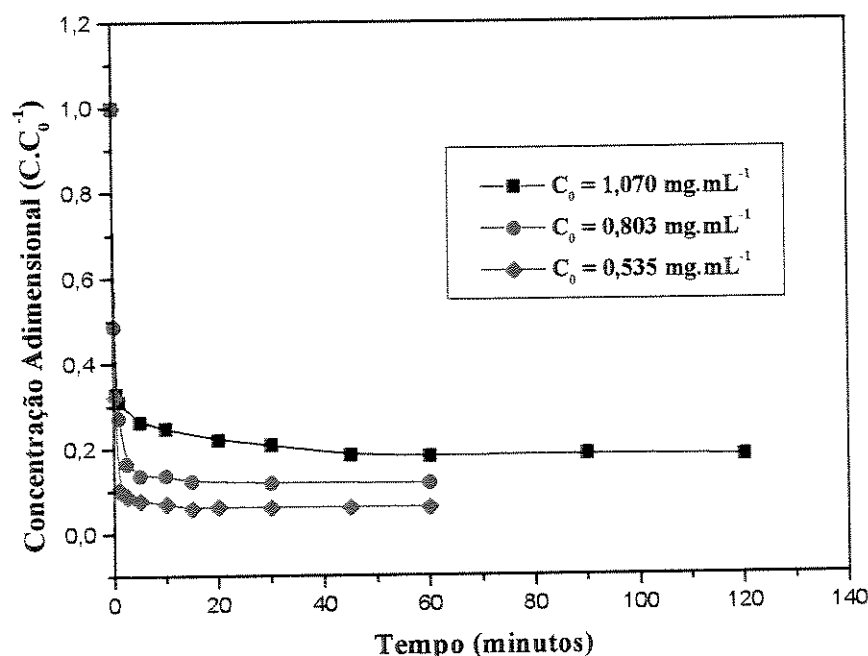


Figura 4.10 - Curvas cinéticas de adsorção de proteína - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 - solução preparada com etapa de ultrafiltração.

Se observarmos na Figura 4.10 a curva cinética de adsorção de proteína, para o maior valor inicial, verificamos que não há tal comportamento. Para as três concentrações iniciais de proteína a concentração diminui rapidamente para cerca de 30% do valor inicial nos primeiros instantes de adsorção. Os dados obtidos sugerem, portanto, que a β -Galactosidase sofre maior efeito da competição das outras espécies químicas presentes em solução.

Poderia-se, ainda, supor que a possível interação dos polifenóis, presentes em solução, com a β -Galactosidase, provoque este comportamento. HASLAM(1974) observou que a interação de polifenóis com a enzima β -Glucosidade não inibiu a atividade da mesma. Deve-se salientar que os dados das curvas cinéticas de adsorção tanto de atividade como de proteína foram tomados para a mesma amostra proveniente do tanque agitado.

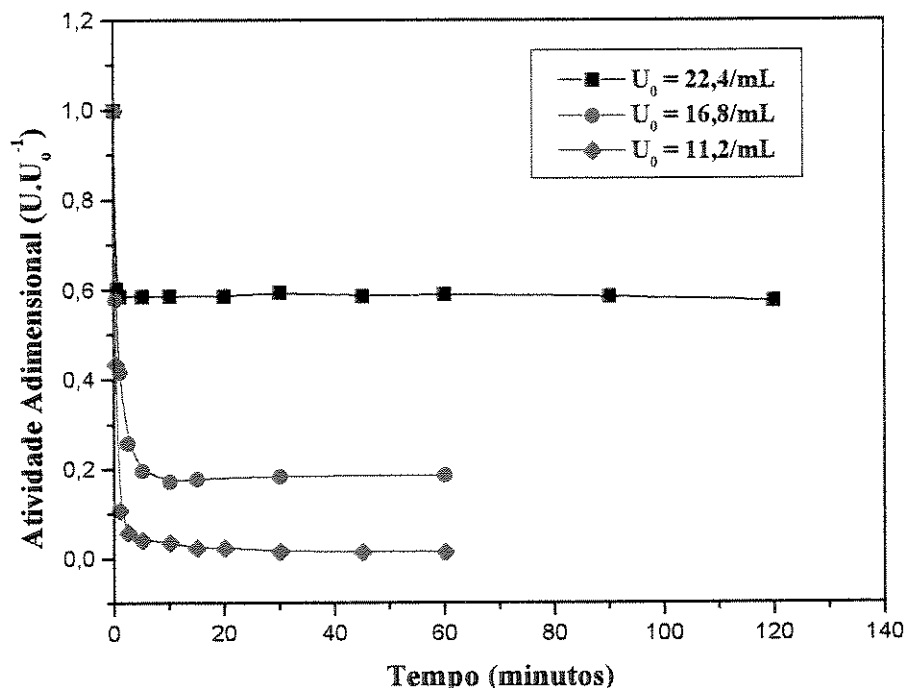


Figura 4.11 - Curvas cinéticas de adsorção de atividade da β -Galactosidase - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 - solução preparada com etapa de ultrafiltração.

Construindo-se as mesmas curvas cinéticas, mostradas nas Figuras 4.10 e 4.11, de tal forma que sejam expressas a massa de proteína e a quantidade de atividade adsorvidas pela resina, em função do tempo, é que se pode verificar claramente essa diferença de comportamento. Nas Figuras 4.12 e 4.13 estão representadas as referidas curvas. A curva referente a concentração inicial igual a $22,4 \text{ U.mL}^{-1}$, a maior utilizada nos ensaios, mostra que uma menor quantidade de atividade foi adsorvida por unidade de massa de resina, quando atingiu-se o equilíbrio.

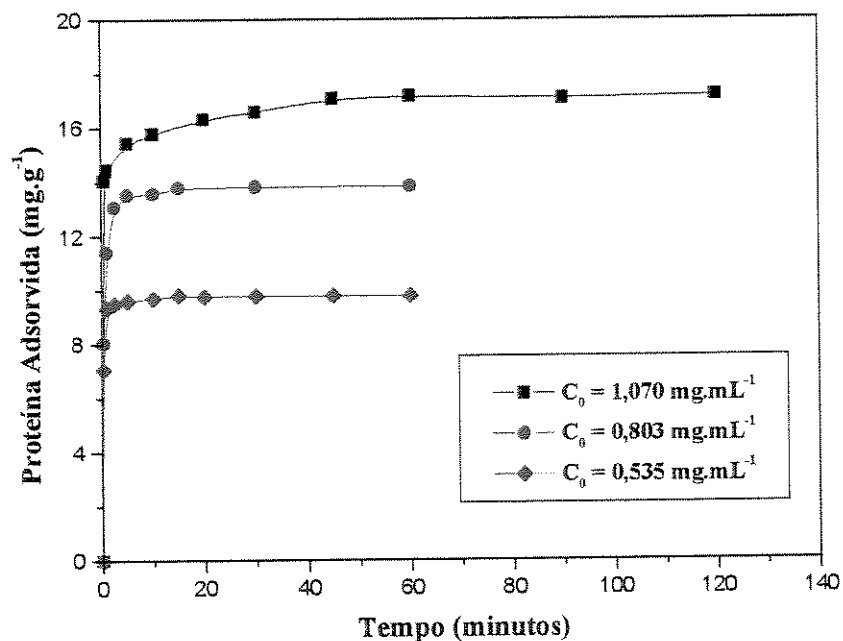


Figura 4.12 - Curvas de proteína adsorvida na resina em função do tempo - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 - solução preparada com etapa de ultrafiltração.

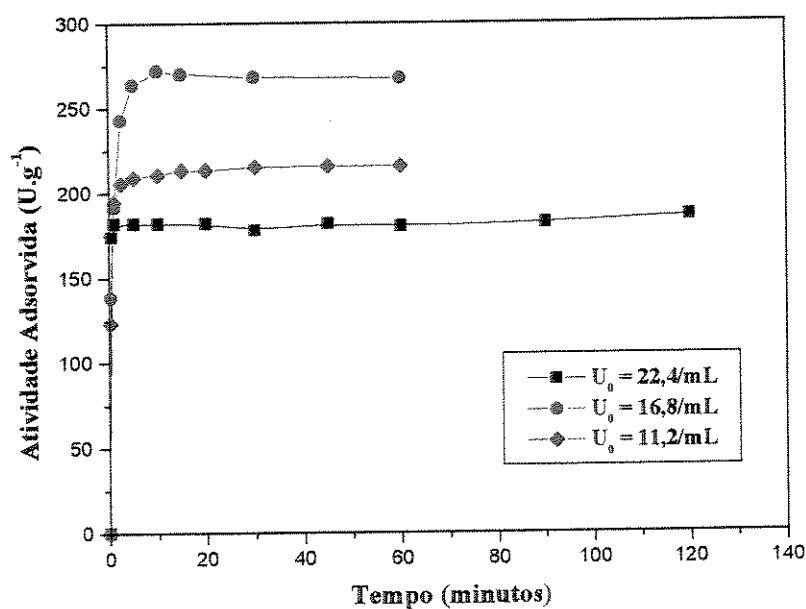


Figura 4.13 - Curvas de atividade adsorvida na resina em função do tempo - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 - solução preparada com etapa de ultrafiltração.

4.7.3. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica

Foram realizados ensaios de adsorção de β -Galactosidase em leito fixo da resina Accell Plus QMA, com o objetivo de obter-se curvas de ruptura. A solução contendo a enzima (tampão A: Tris-HCl 30 mM pH 7,5) foi preparada com a utilização de uma etapa de ultrafiltração em membrana com corte para moléculas maiores que 10 kDa. Injetou-se na coluna cromatográfica (Pharmacia modelo 5/5 (0,5 cm de diâmetro; 2,8 cm de leito de resina)) 50 mL da solução contendo a enzima (atividade inicial $0,7 \text{ U.mL}^{-1}$; proteína inicial $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$). A etapa de lavagem (5 mL) foi realizada com o tampão A. A eluição foi realizada com o tampão B (tampão A contendo 1 M NaCl) e tampão A, combinados de forma que se obtivesse degraus ("step") de concentração de NaCl. Na Figura 4.14 mostra-se um cromatograma obtido.

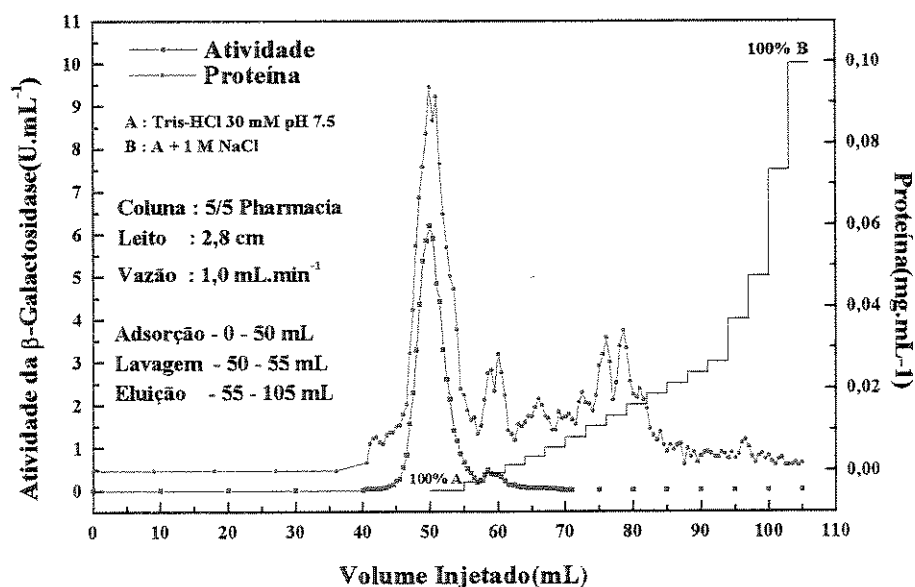


Figura 4.14 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accell Plus QMA. A - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de ultrafiltração.

Observa-se na Figura 4.14, que após a injeção de 46 mL de solução contendo β -Galactosidase(atividade inicial de $0,7 \text{ U.mL}^{-1}$), a atividade de saída no topo da coluna é igual àquela da solução que está sendo injetada. Quando interrompeu-se a injeção, e iniciou-se a etapa de lavagem, a atividade da enzima na saída era cerca de 9 vezes maior que aquela da solução que foi injetada. Durante a lavagem observou-se a saída de enzima(atividade) no topo da coluna. Pode-se, então, supor que moléculas de outras substâncias presentes deslocaram a β -Galactosidase, provocando o fenômeno denominado "roll-up", como descrito em JAMES(1994).

Fez-se um novo ensaio de adsorção de β -Galactosidase, porém de tal forma que a etapa de adsorção(foram injetados 52 mL de solução) foi encerrada antes que houvesse a saída da enzima no topo da coluna. Utilizou-se as mesmas condições descritas no ensaio anterior. O cromatograma obtido está representado na Figura 4.15.

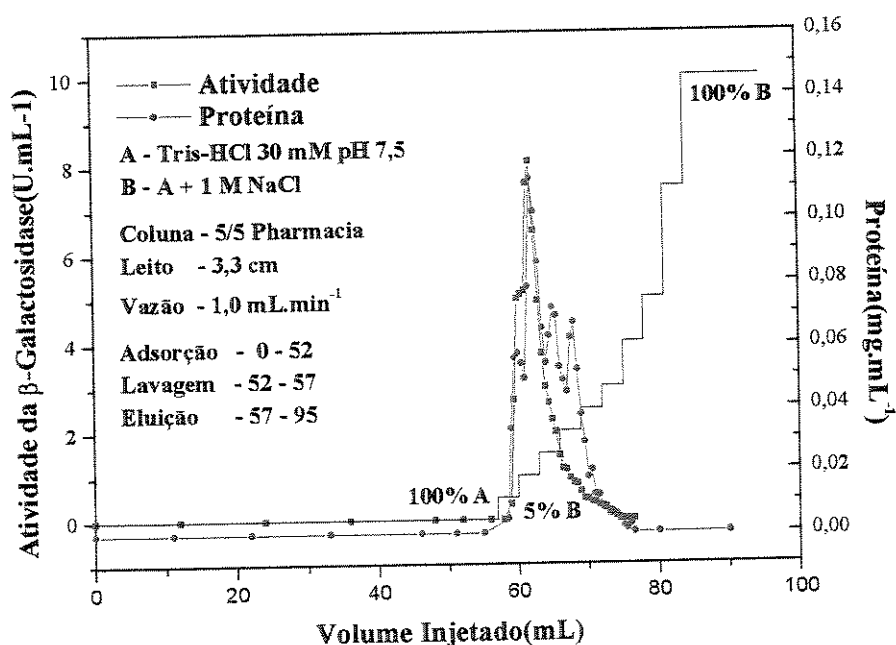


Figura 4.15 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accell Plus QMA; injeção sem provocar a ruptura("breakthrough"). A - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de ultrafiltração.

Observa-se na Figura 4.15 que a eluição da β -Galactosidase, medida pela sua atividade enzimática, iniciou-se com de 5% do tampão B, ou seja, concentração de 50 mM de NaCl no tampão resultante da mistura de A e B. Com 15% do tampão B praticamente toda a β -Galactosidase havia sido eluída da resina. Portanto, com baixa força iônica pode-se remover a enzima adsorvida na resina Accel Plus QMA. As frações coletadas no pico de eluição correspondem a 65% da atividade injetada, com atividade específica de $83,8 \text{ U.mg}^{-1}$. Isto representa um fator de purificação de 2,2 vezes em relação àquela inicial.

Nas Figuras 4.16 e 4.17 mostra-se os cromatogramas de adsorção de atividade enzimática e de proteína para uma outra condição do tampão (Bis-Tris 20 mM pH 6,5) utilizado para preparo da solução contendo a enzima.

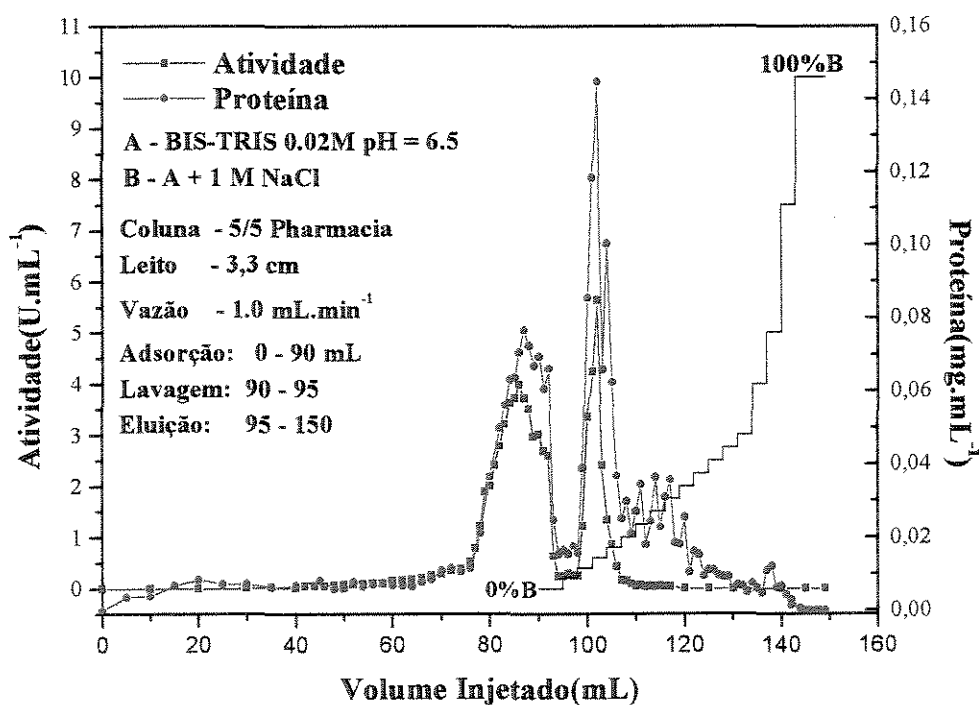


Figura 4.16 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accel Plus QMA. A - tampão Bis-Tris 20 mM pH 6,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de ultrafiltração.

A Figura 4.16 corresponde à tentativa de construção de uma curva de ruptura. Nota-se que o comportamento do sistema é similar àquele obtido na Figura 4.14. Tanto a enzima, medida pela sua atividade, como as outras proteínas saem no topo da coluna em concentrações superiores àquela injetada. Dessa forma, uma parte significativa da enzima foi expelida da coluna durante a etapa de adsorção. A enzima que ficou adsorvida na resina já estava totalmente eluída quando o tampão de eluição atingiu 80 mM de NaCl.

Na Figura 4.17 apresenta-se o cromatograma referente a injeção de um volume de solução (55 mL), de tal forma que a frente de adsorção não atingiu o topo da coluna. Nesta situação, toda enzima ficou adsorvida na resina, e não foi observada nas frações coletadas na lavagem. Na etapa de eluição a enzima é dessorvida da resina com concentrações de NaCl no tampão na faixa de 20 mM a 100 mM.

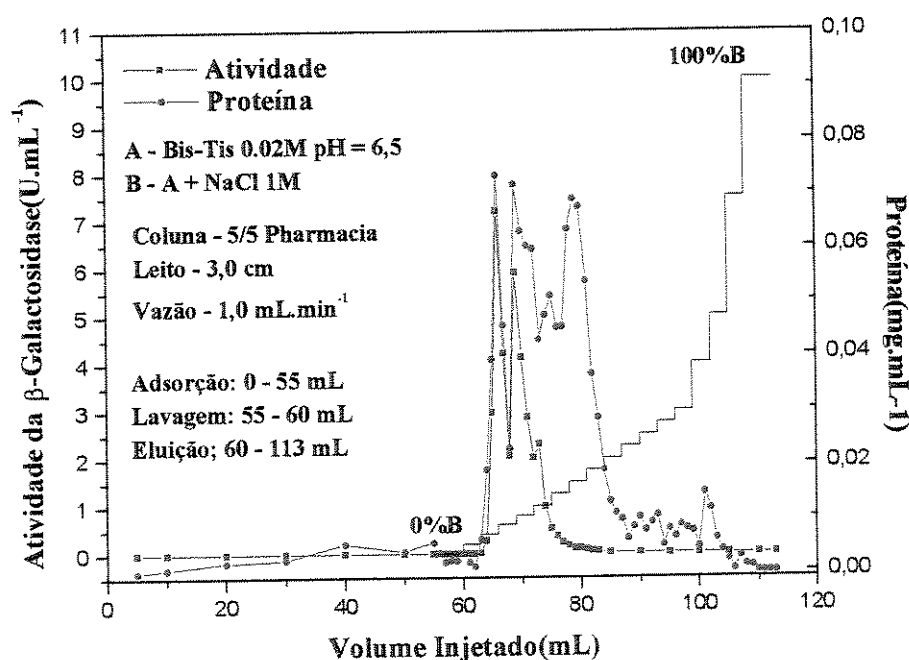
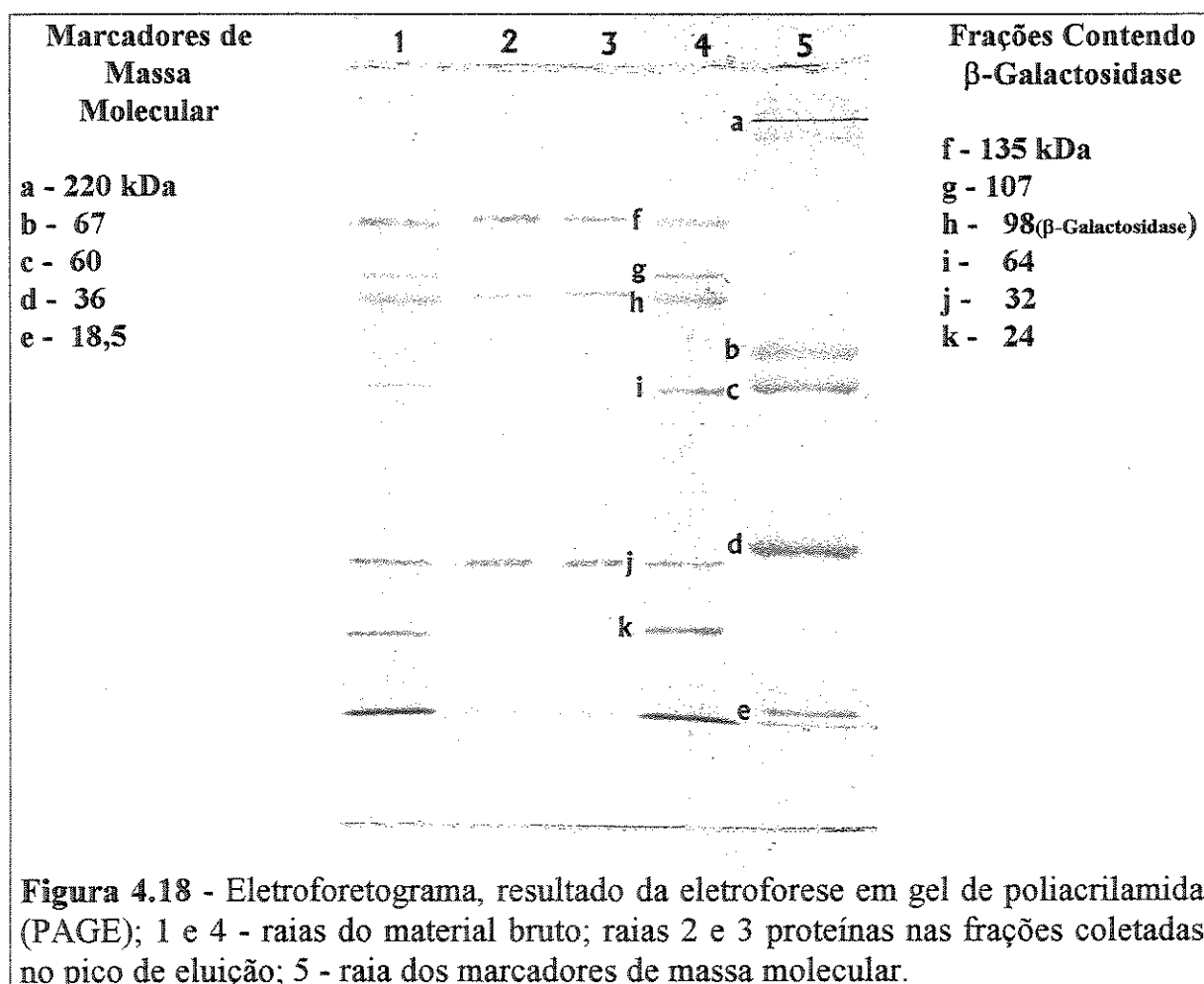


Figura 4.17 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accell Plus QMA; injeção sem provocar a ruptura. A - tampão Bis-Tris 20 mM pH 6,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de ultrafiltração.

A obtenção de dois picos de atividade, cromatograma mostrado na Figura 4.17, pode ser explicado. O primeiro pico corresponde à enzima que estava sendo deslocada no fenômeno denominado de "roll-up", e o segundo refere-se àquela β -Galactosidase que estava realmente adsorvida na resina.

Fez-se análise, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, das proteínas que estão nas frações coletadas no pico de eluição mostrado na Figura 4.15. O eletroforetograma resultante é apresentado na Figura 4.18. Verifica-se que a β -Galactosidase é eluída juntamente com outras duas proteínas, para as frações coletadas em torno do pico, ou seja, juntamente com uma de maior massa molecular(135 kDa) e outra de menor massa molecular(32 kDa)



4.8. Ensaio de Adsorção com Material Precipitado em Acetona

Determinou-se o teor de polifenóis em solução preparada a partir do material bruto liofilizado. De acordo com a escala de PRICE e BUTLER, 1977, essa solução possui alto teor de taninos e outros polifenóis.

Com o objetivo de verificar o efeito da acetona na remoção de substâncias tais como taninos e outros polifenóis presentes em solução preparada a partir do material bruto liofilizado, fez-se ensaios com soluções preparadas a partir do material proveniente de uma etapa de precipitação em acetona. A precipitação em acetona reduziu o teor de polifenóis, e de acordo com a escala de PRICE e BUTLER(1977), pode-se classifica-lo de moderadamente alto.

4.8.1. Isotermas de Adsorção de Proteína e de Atividade

Nas Figuras 4.19 e 4.20 são apresentadas as isotermas de adsorção de proteína e de atividade da β -Galactosidase, respectivamente. As soluções contendo β -Galactosidase, utilizadas nos ensaios, foram preparadas com a utilização de uma etapa de precipitação com acetona, seguida de liofilização dos sólidos coletados na centrifugação. Nestes ensaios não foi realizada a etapa de ultrafiltração em membrana com poros para corte de moléculas maiores que 10 kDa.

O comportamento dos dados da isoterma de adsorção de proteína mostrados na Figura 4.19 é igual ao obtido no ensaio em que se utilizou uma etapa de ultrafiltração para preparo da solução contendo a β -Galactosidase (Figura 4.7). Entretanto, observa-se que a capacidade de adsorção de proteína e de enzima pela resina Accell Plus QMA, neste caso, é muito menor que a obtida quando fez-se uma etapa de ultrafiltração.

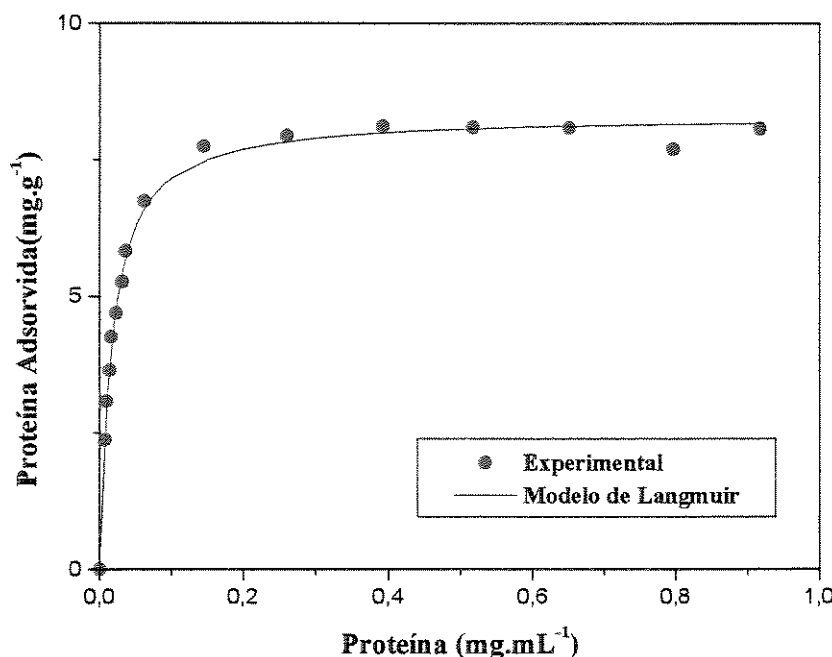


Figura 4.19 - Isotherma de adsorção de proteína - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 - material preparado com etapa de precipitação em acetona.

Os dados da isoterma de adsorção de atividade mostrados na Figura 4.20 tem comportamento similar àqueles mostrados na Figura 4.8, que são referentes ao ensaio em que se utilizou uma etapa de ultrafiltração para preparo da solução contendo a β -Galactosidase. Tal como no caso da isoterma de adsorção de proteína, observa-se que a capacidade de adsorção de proteína e de enzima pela resina foi menor.

Uma parte dos dados da isoterma de adsorção de atividade da β -Galactosidase tem o comportamento do modelo de Langmuir, como pode ser observado na Figura 4.21.

Fez-se uma avaliação quantitativa dos resultados experimentais mostrados nas Figuras 4.19 e 4.21, através do ajuste do modelo de isoterma proposto por Langmuir, equação 5. Os resultados dos ajustes são mostrados na Tabela 4.3.

Observa-se nas Figuras 4.19 e 4.21 que o modelo de Langmuir ajusta-se bem aos dados experimentais, e isto é comprovado pelo valor elevado do coeficiente de determinação (R^2). Comparando-se os valores da constante de dissociação, k_d , nas Tabelas 4.2 e 4.3, verificamos que eles tem a mesma ordem de grandeza, porém os obtidos com o material sofrendo uma etapa de precipitação com acetona são três vezes menores.

Tabela 4.3 - Parâmetros do Modelo de Langmuir; material preparado com precipitação em acetona.

Isoterma de Adsorção de Proteína		Isoterma de Adsorção de Atividade	
Γ_m	8,32 mg.g ⁻¹	Γ_m	81,9 U.g ⁻¹
K_d	0,01621 mg.mL ⁻¹	k_d	0,0157 U.mL ⁻¹
$R^2 = 0,99$		$R^2 = 0,96$	
q_m	9,81 mg.mL ⁻¹	q_m	96,7 U.mL ⁻¹
k_d	0,01621 mg.mL ⁻¹	k_d	0,0157 U.mL ⁻¹

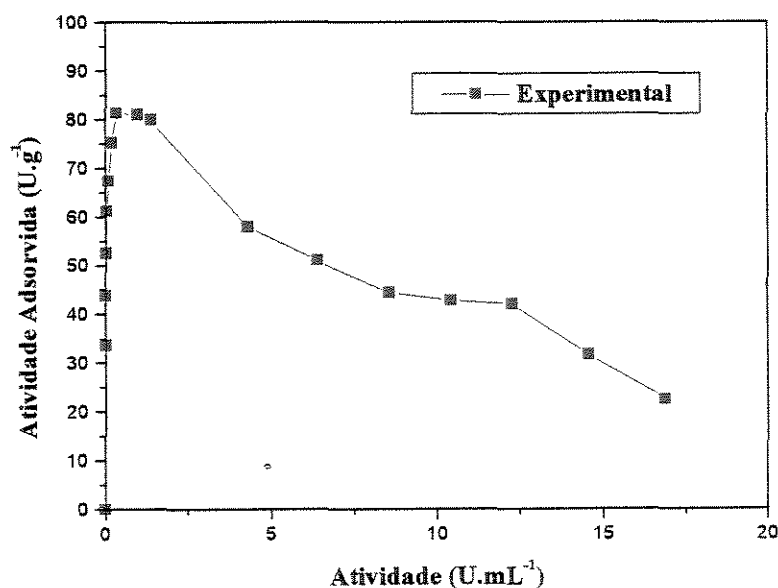


Figura 4.20 - Isoterma de adsorção de atividade da β -Galactosidase; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona.

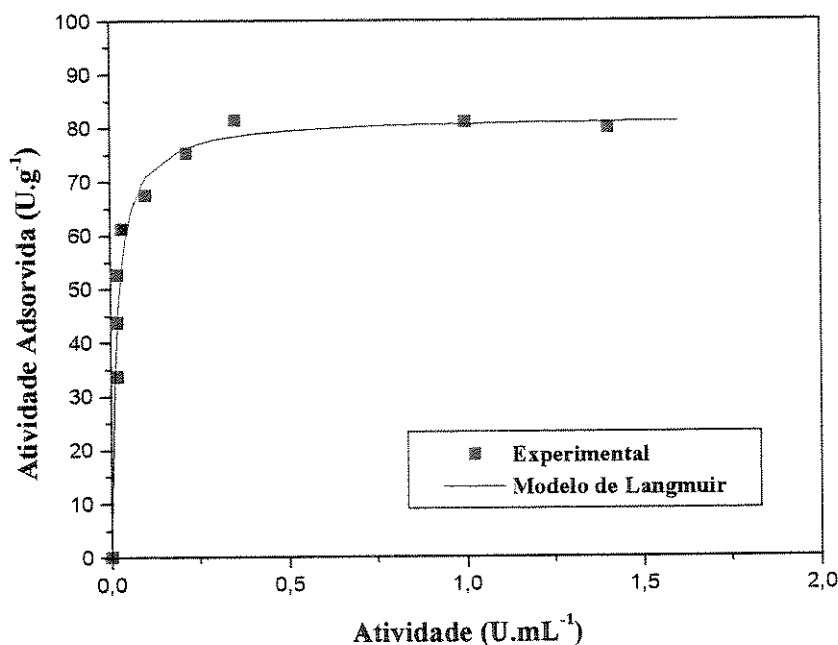


Figura 4.21 - Dados parciais da isoterma de adsorção de atividade da β -Galactosidase; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona.

4.8.2. Curvas Cinéticas de Adsorção em Tanque Agitado

As curvas cinéticas obtidas para três valores iniciais de concentração de proteína e de atividade da enzima estão representadas nas Figuras 4.22 e 4.23, respectivamente.

Observa-se nestas curvas que a concentração de proteína, e também de atividade da β -Galactosidase, em solução no tanque agitado diminuem rapidamente nos primeiros instantes do processo de adsorção. Após 10 minutos de adsorção no tanque a variação da concentração é muito pequena. O comportamento é similar ao observado nas curvas cinéticas mostradas nas Figuras 4.10 e 4.11, quando utilizou-se a etapa de ultrafiltração para o preparo da solução contendo a enzima.

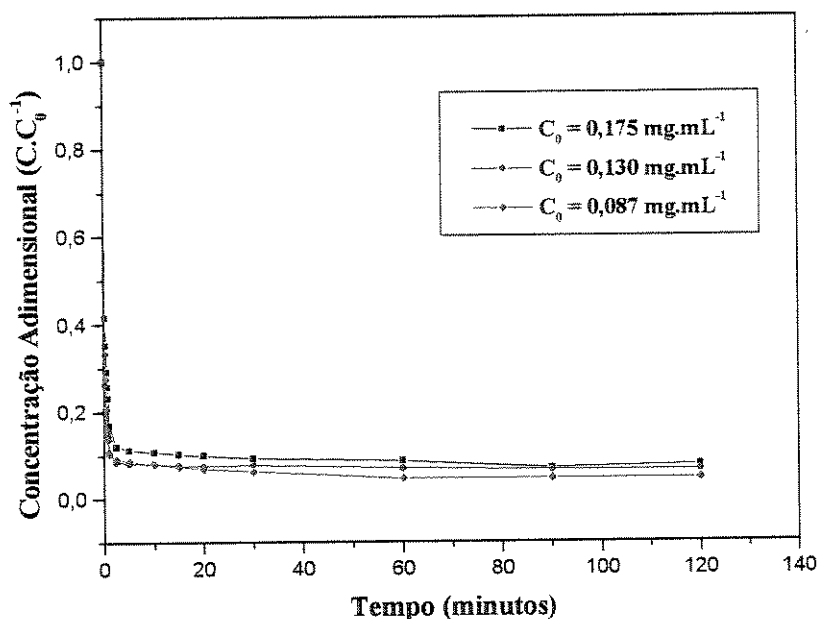


Figura 4.22 - Curvas cinéticas de adsorção de proteína; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona.

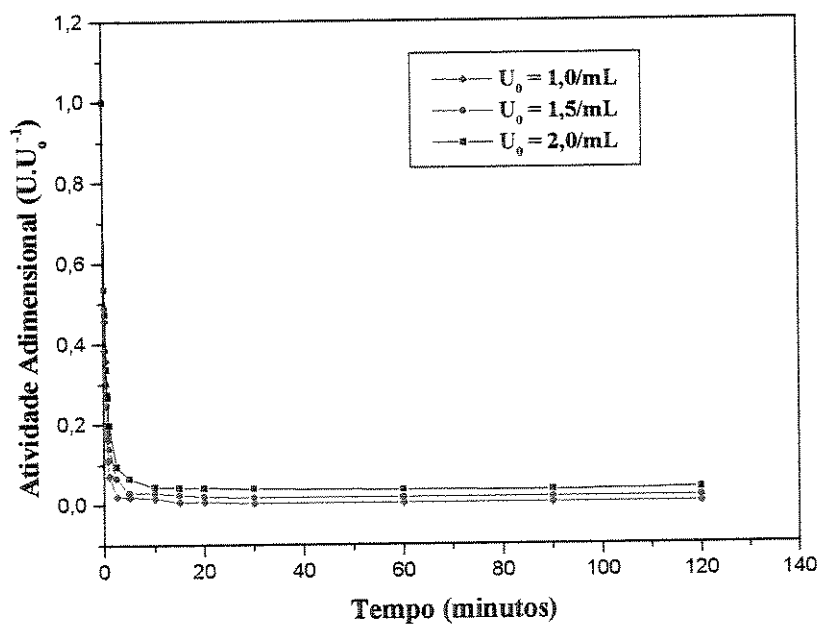


Figura 4.23 - Curvas cinéticas de adsorção de atividade da β -Galactosidase; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona.

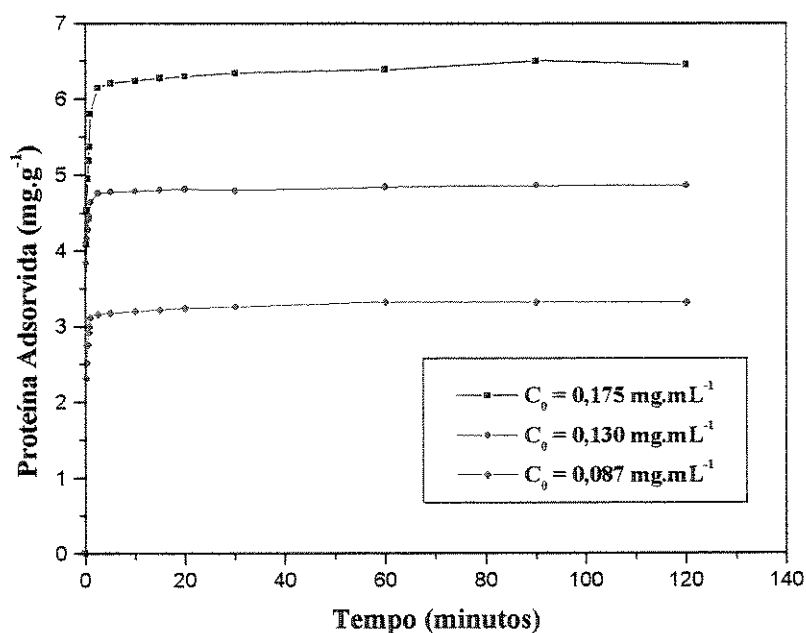


Figura 4.24 - Curvas de proteína adsorvida na resina em função do tempo; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona.

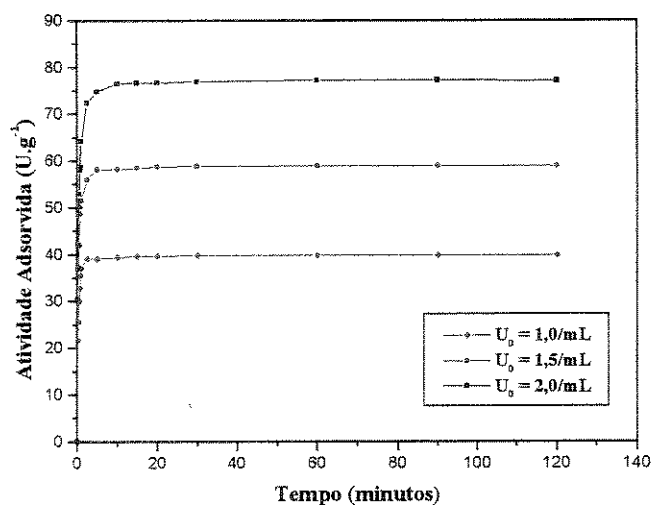


Figura 4.25 - Curvas de atividade da β -Galactosidase adsorvida na resina em função do tempo; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona.

As curvas de atividade da β -Galactosidase adsorvida na resina em função do tempo (Figura 4.25) não apresentam comportamento diferente do esperado, tal como foi observado no ensaio que se utilizou ultrafiltração para o preparo da solução contendo a enzima (Figura 4.13). Isso pode ser explicado, visto que nos ensaios que deram origem aos dados da Figura 4.25 utilizou-se valores iniciais baixos para a atividade da β -Galactosidase em solução.

4.8.3. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica

Foram realizados ensaios de adsorção de β -Galactosidase em leito fixo da resina Accell Plus QMA. A solução contendo a enzima (tampão A: Tris-HCl 30 mM pH 7,5) foi preparada com a utilização de uma etapa de precipitação em acetona. Na Figura 4.26 mostra-se o cromatograma para o ensaio em que injetou-se um volume de solução, sem ter-se, contudo, a ruptura.

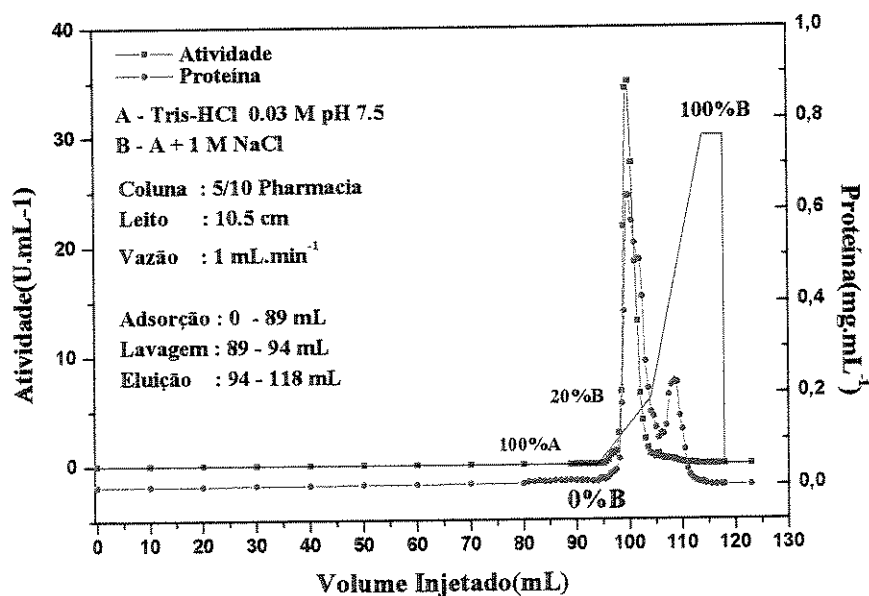


Figura 4.26 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accell Plus QMA; injeção de um volume; A - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de precipitação em acetona.

O ensaio consistiu em injetar-se um volume de solução, de tal forma que estivesse muito próxima a saída de atividade no topo da coluna. Injetou-se na coluna cromatográfica(Pharmacia modelo 10/5; 0,5 cm de diâmetro; 10,5 cm de leito) 89mL da solução contendo a enzima(atividade inicial $1,05 \text{ U.mL}^{-1}$; proteína inicial $0,067 \text{ mg.mL}^{-1}$, atividade específica igual a $15,7 \text{ U.mg}^{-1}$). A etapa de lavagem(5mL) foi realizada com o tampão A. A eluição foi realizada com o tampão B(tampão A contendo 1 M NaCl) e tampão A, combinados de forma que se obtivesse um gradiente de concentração de NaCl

Observa-se na Figura 4.26, que praticamente toda atividade da β -Galactosidase é eluída da coluna antes que atinja-se 20% do tampão B no gradiente de sal. As outras proteínas, que não foram eluídas juntamente com a enzima, foram removidas quando o gradiente de sal possui cerca de 45% do Tampão B. Neste ensaio, tal como naqueles realizados utilizando-se uma etapa de ultrafiltração, a β -Galactosidase foi eluída da resina com baixa força iônica. As frações coletadas no pico de eluição correspondem a 80% da atividade injetada, com atividade específica de $41,9 \text{ U.mg}^{-1}$. Isto representa um fator de purificação de 2,6 vezes em relação àquela inicial.

Foram realizados, também, ensaios de adsorção de β -Galactosidase em leito fixo da resina Accell Plus QMA com o objetivo de obter-se curvas de ruptura. O resultado de um ensaio é mostrado na Figura 4.27. Neste ensaio injetou-se na coluna cromatográfica(Pharmacia modelo 10/5; 0,5 cm de diâmetro; 10,5 cm de leito de resina) 95,5 mL da solução contendo a enzima(atividade inicial $1,05 \text{ U.mL}^{-1}$; proteína inicial $0,067 \text{ mg.mL}^{-1}$). Observa-se, no cromatograma, que havia a saída de enzima no topo da coluna(cerca de 3 vezes a concentração inicial) quando encerrou-se a etapa de adsorção. A etapa de lavagem(5mL) foi realizada com o tampão A.

A eluição foi realizada com o tampão B(tampão A contendo 1 M NaCl) e tampão A, combinados de forma que se obtivesse primeiro um passo("step") de concentração de 20% do tampão B no de eluição. Em seguida fez-se um gradiente até que fosse atingido

100% do tampão B. Decidiu-se pelo "step" inicial de 20% do tampão B, visto que até esta força iônica a enzima é, praticamente, toda eluída da resina.

Da mesma forma que no ensaio anterior, em que injetou-se um volume de solução sem saturar a coluna, observa-se um pico em que foi eluída a β -Galactosidase, juntamente com outras proteínas, e um outro com as proteínas que exigem maior força iônica para serem eluídas da resina.

Nos ensaios anteriores, sem utilizar a precipitação com acetona, ficavam substâncias retidas na resina aniônica, as quais davam a esta uma coloração escura, principalmente na base da coluna. Nem com as recomendações do fornecedor estas substâncias eram removidas da resina. O mesmo não acontece com a solução preparada com a utilização de uma etapa de precipitação em acetona, visto que observa-se após os ensaios que a resina fica praticamente limpa após a sanitização recomendada pelo fornecedor da mesma.

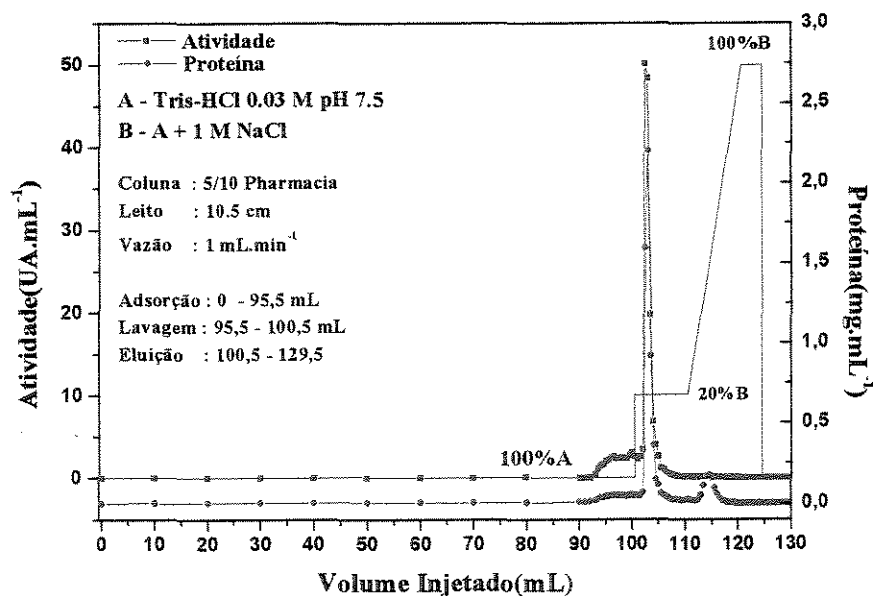


Figura 4.27 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accell Plus QMA; A - tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de precipitação em acetona

Um fato relevante de ser observado no cromatograma mostrado na Figura 4.27 refere-se à etapa de adsorção. Injetou-se solução até que a resina estivesse saturada, e o fenômeno denominado “roll-up” não foi acentuado, tal como mostrado na Figura 4.14.

A precipitação com acetona foi efetiva para a remoção de algumas substâncias presentes na solução preparada com o extrato bruto, e isso melhorou o comportamento da adsorção em coluna cromatográfica. Porém, a capacidade da resina é menor que a observada nos ensaios em que efetuou-se a etapa de ultrafiltração.

Na Figura 4.28 mostra-se o eletroforetograma realizado com amostras coletadas no pico de eluição da β -Galactosidase (referente ao cromatograma mostrado na Figura 4.26). Nota-se que o resultado é idêntico ao obtido no eletroforetograma mostrado na Figura 4.18.

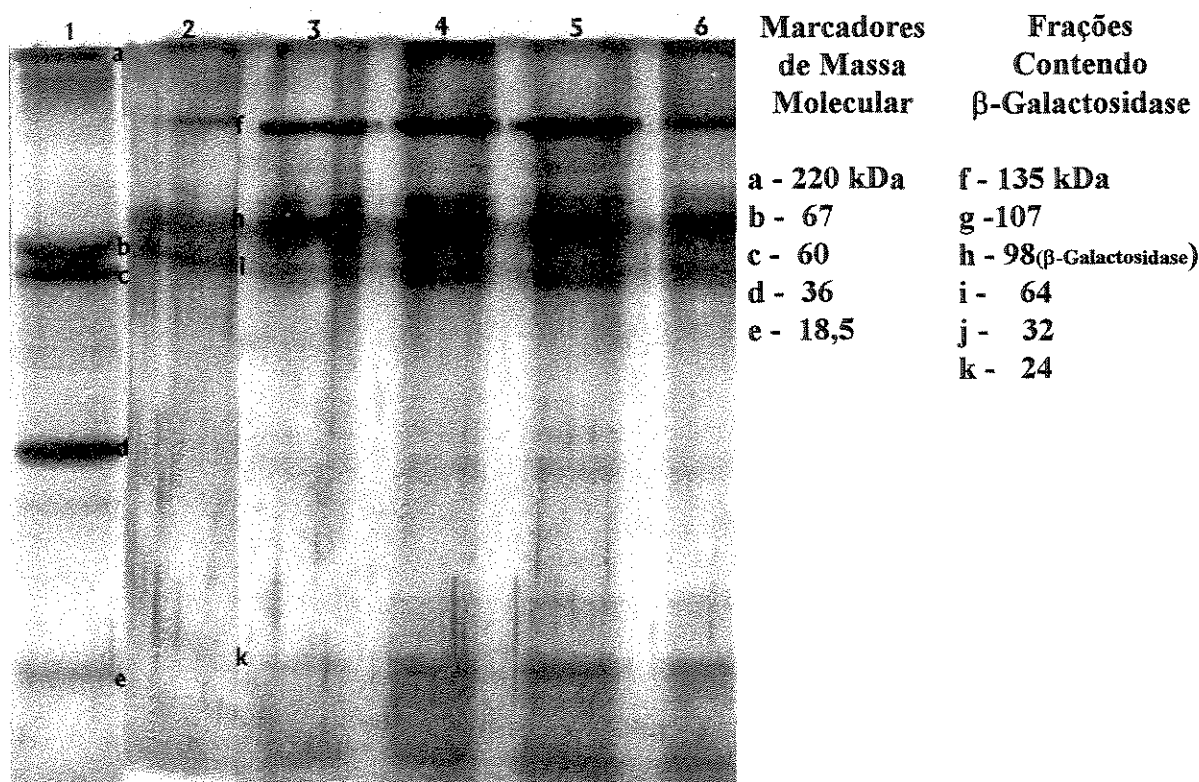


Figura 4.28 - Eletroforetograma, resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); 1 - raia do marcador de massa molecular; 2 a 6 - raias das frações coletadas do início ao final do pico de eluição.

4.9. Ensaio de Adsorção com Material Precipitado em Acetona e Ultrafiltrado

Com o objetivo de verificar o efeito simultâneo da precipitação em acetona e ultrafiltração na remoção de substâncias tais como taninos e outros polifenóis presentes no material bruto contendo a β -Galactosidase, fez-se ensaios com soluções preparadas com material proveniente de uma etapa de precipitação com acetona seguido de ultrafiltração em membrana com corte para moléculas maiores que 10 kDa. A ultrafiltração foi efetuada de forma que fosse coletado um volume filtrado equivalente a três vezes o volume inicial da solução que continha a enzima. O teor de taninos e outros polifenóis presentes em solução era de intermediário para moderadamente alto, de acordo com a escala de PRICE e BUTLER(1997).

4.9.1. Isotermas de Adsorção de Proteína e de Atividade

Nas Figuras 4.29 e 4.30 são apresentados os dados experimentais obtidos para as isotermas de adsorção de proteína e de atividade da β -Galactosidase, respectivamente, bem como o resultado do ajuste do modelo de Langmuir a esses dados. Na Tabela 4.4 estão os valores numéricos referentes aos parâmetros do modelo de Langmuir.

Tabela 4.4 - Parâmetros do Modelo de Langmuir; material preparado com precipitação em acetona e ultrafiltração.

Isoterma de Adsorção de Proteína		Isoterma de Adsorção de Atividade	
Γ_m	27,95 mg.g ⁻¹	Γ_m	386,2 U.g ⁻¹
k_d	0,04012 mg.mL ⁻¹	k_d	0,05828 U.mL ⁻¹
$R^2 = 0,99$		$R^2 = 0,98$	
q_m	32,98 mg.mL ⁻¹	q_m	455,7 U.mL ⁻¹
k_d	0,04012 mg.mL ⁻¹	k_d	0,05828 U.mL ⁻¹

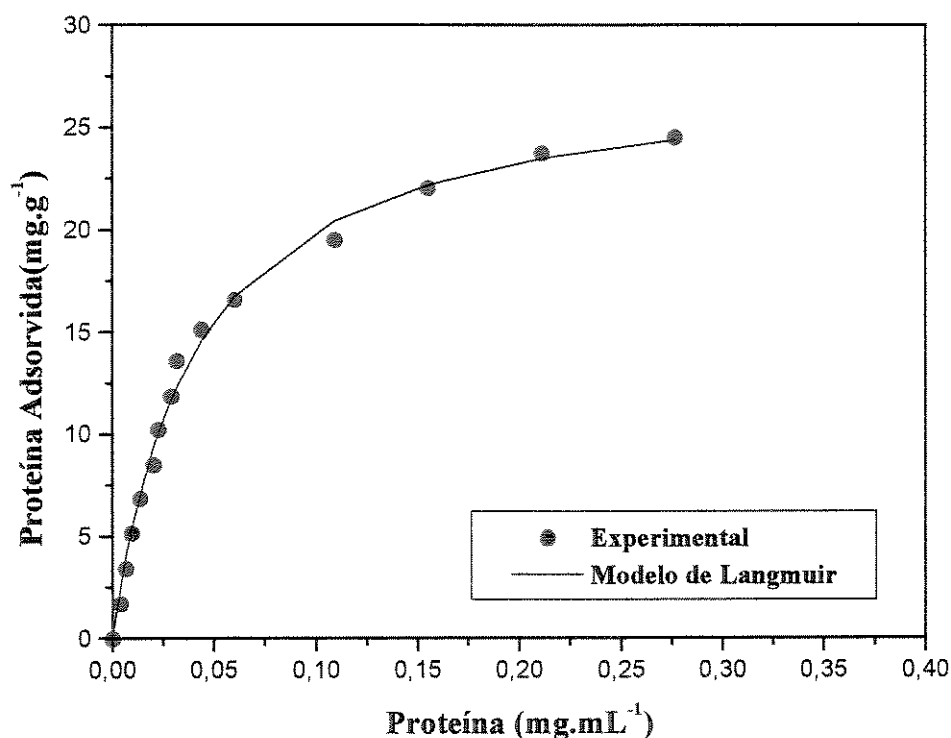


Figura 4.29 - Isotherma de adsorção de proteína; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona e ultrafiltração.

Observa-se que o comportamento da isoterma de adsorção de proteína, Figura 4.29, e também o da isoterma de adsorção de atividade, Figura 4.30, são similares àqueles obtidos quando fez-se o preparo da solução utilizando-se somente a etapa de ultrafiltração (Figuras 4.7 e 4.9).

O valor da capacidade máxima, q_m , obtido nesses ensaios, tanto para proteína adsorvida como para atividade adsorvida na resina, são menores que aqueles obtidos quando fez-se o preparo da amostra somente com a etapa de ultrafiltração; em torno de 20% para a capacidade máxima de proteína adsorvida, e 10% para a capacidade máxima de enzima (atividade) adsorvida na resina. A diferença fundamental está no fato de que naquele primeiro ensaio, na etapa de ultrafiltração, trocou-se mais vezes o tampão, e isso removeu uma quantidade maior daquelas substâncias que estão interferindo no processo de adsorção.

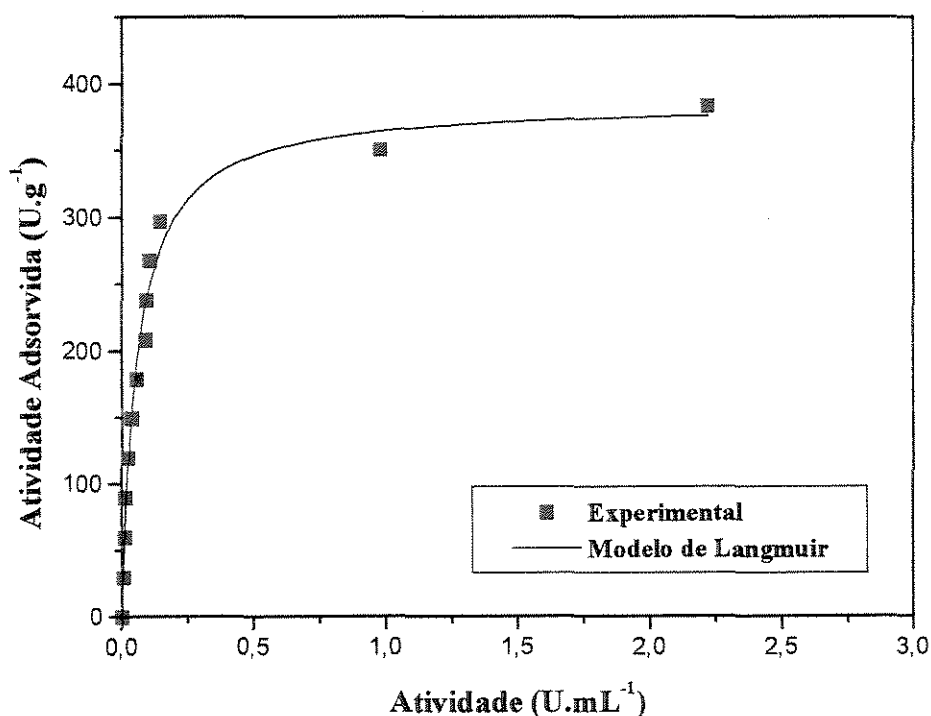


Figura 4.30 - Isotherma de adsorção de atividade; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com precipitação em acetona e ultrafiltração

Por outro lado, as constantes de dissociação, k_d , além de terem a mesma ordem de grandeza em ambas as formas de preparo da solução contendo a β -Galactosidase, são numericamente muito próximas, como pode ser visto nas Tabelas 4.2 e 4.4.

4.9.2. Curvas Cinéticas de Proteína e de Atividade Adsorvidas na Resina

As curvas cinéticas de proteína e de atividade da enzima adsorvidas na resina, obtidas para três valores iniciais de concentração, estão representadas nas Figuras 4.31 e 4.32, respectivamente.

Observa-se nestas curvas, Figuras 4.31 e 4.32, que a concentração de proteína, e também de atividade, em solução no tanque agitado aumenta rapidamente nos primeiros instantes do processo de adsorção. Após 20 minutos, já foi estabelecido o equilíbrio entre as concentrações de proteína, e também de atividade da enzima, que estão em solução, com aquelas adsorvidas na resina.

Essas curvas cinéticas foram construídas para valores iniciais baixos para a atividade da β -Galactosidase em solução. Por esse motivo não é observado nenhum comportamento fora do esperado, tal como ocorreu no ensaio em que utilizou-se a etapa de ultrafiltração para o preparo da solução.

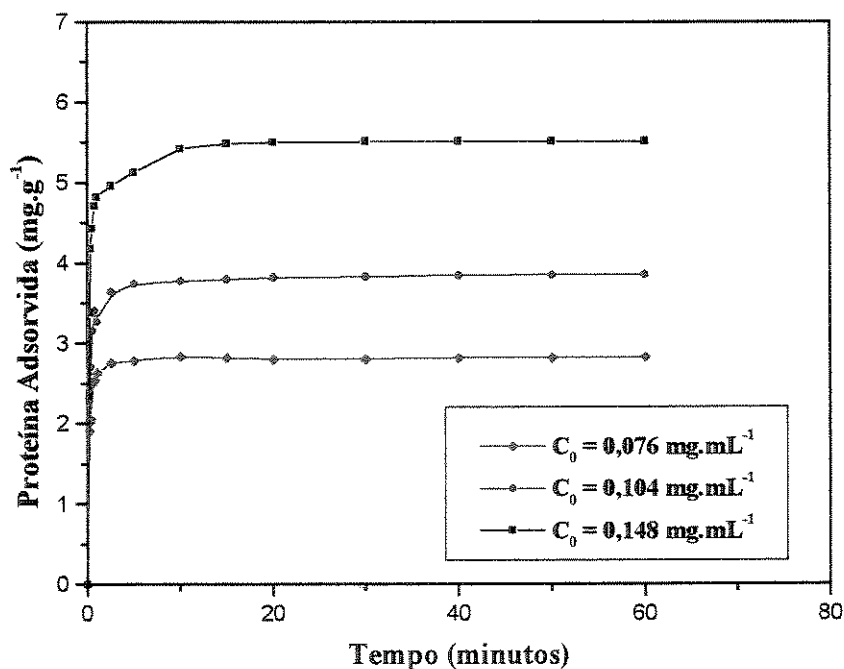


Figura 4.31 - Curvas de proteína adsorvida na resina em função do tempo; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com etapa de precipitação em acetona e ultrafiltração.

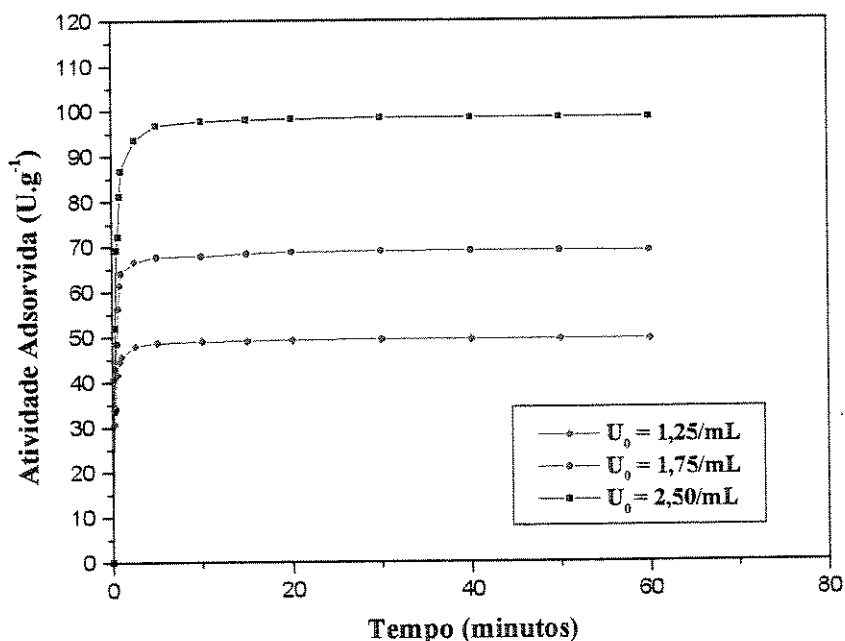


Figura 4.32 - Curvas de atividade da β -Galactosidase adsorvida na resina em função do tempo; tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; material preparado com etapa de precipitação em acetona e ultrafiltração.

4.9.3. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica

Foram realizados ensaios de adsorção de β -Galactosidase em leito fixo da resina Accell Plus QMA com o objetivo de obter-se curvas de ruptura. A solução contendo a enzima (tampão A: Tris-HCl 30 mM pH 7,5) foi preparada com a utilização de uma etapa de precipitação em acetona seguida de ultrafiltração. O resultado de um ensaio é mostrado na Figura 4.33.

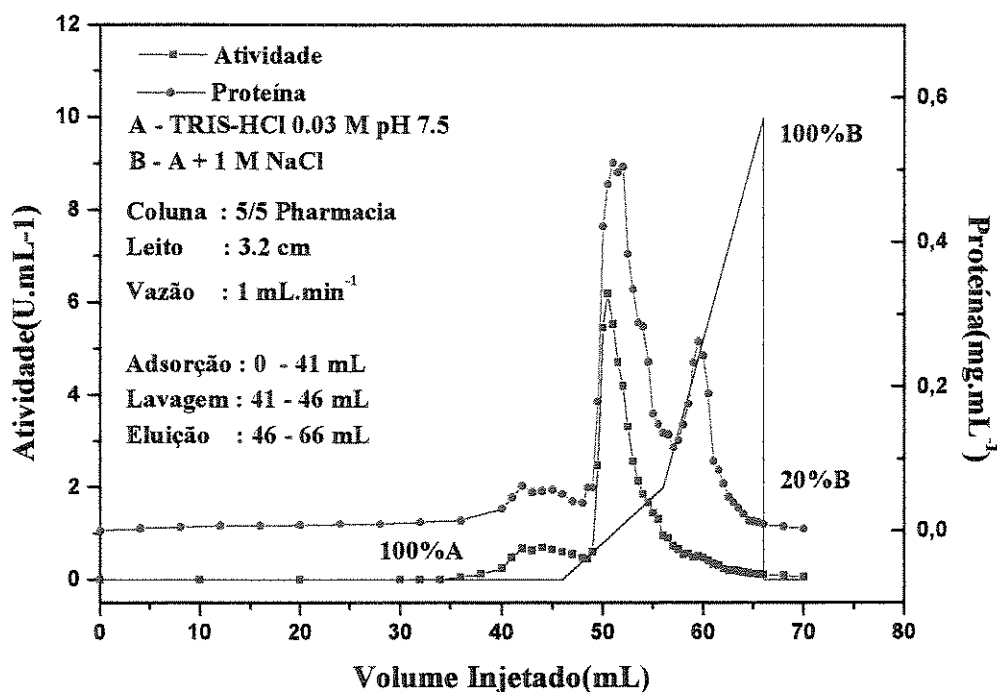


Figura 4.33 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accell Plus QMA; A – tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de precipitação em acetona, e ultrafiltração.

Neste ensaio injetou-se na coluna cromatográfica(Pharmacia modelo 5/5; 0,5 cm de diâmetro; 3,2 cm de leito de resina) 41 mL da solução contendo a enzima(atividade inicial 0,84 U.mL⁻¹; proteína inicial 0,11 mg.mL⁻¹, atividade específica igual a 7,63 U.mg⁻¹). Observa-se, no cromatograma, que havia a saída de enzima no topo da coluna(aproximadamente igual a concentração da solução de alimentação), quando encerrou-se a etapa de adsorção. A etapa de lavagem(5mL) foi realizada com o tampão A.

A eluição foi realizada com o tampão B(tampão A contendo 1 M NaCl) e tampão A, combinados de forma que se obtivesse primeiro um gradiente de concentração até que

se atingisse 20% do tampão B no de eluição. Em seguida fez-se um gradiente até que fosse atingido 100% do tampão B.

Observa-se na Figura 4.33, que praticamente toda atividade da β -Galactosidase é eluida da coluna antes que atinja-se 20% do tampão B no gradiente de sal. As outras proteínas que não foram eluidas juntamente com a enzima o são quando o gradiente de sal possui cerca de 45% do Tampão B. Neste ensaio, tal como naqueles outros realizados anteriormente a β -Galactosidase foi eluida da resina com baixa força iônica.

As frações coletadas no pico de eluição correspondem a 63% da atividade injetada, com atividade específica de $10,0 \text{ U.mg}^{-1}$. Isto representa um fator de purificação de 1,3 vezes em relação àquela inicial. O eletroforetograma mostrou resultados iguais aos obtidos anteriormente (Figuras 4.18 e 4.28).

4.10. Uso de Diálise para Preparo de Solução

Com o objetivo de verificar o efeito simultâneo da precipitação em acetona, da ultrafiltração, e da diálise na remoção de substâncias tais como taninos e outros polifenóis presentes no material bruto contendo a β -Galactosidase, fez-se um ensaio de adsorção em coluna cromatográfica. A solução foi preparada com material proveniente de uma etapa de precipitação com acetona, seguida de ultrafiltração em membrana com corte para moléculas maiores que 10 kDa, e diálise em membrana com corte para o mesmo tamanho de molécula (quatro troca de tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5, em intervalos de 12 horas). A ultrafiltração foi efetuada de forma que fosse coletado um volume filtrado equivalente a cinco vezes o volume inicial da solução que continha a enzima. O teor de taninos e outros polifenóis presentes em solução era de baixo para intermediário, de acordo com a escala de PRICE e BUTLER (1997).

4.10.1. Adsorção e Eluição em Coluna Cromatográfica

Foram realizados ensaios de adsorção de β -Galactosidase em leito fixo da resina Accell Plus QMA. A solução contendo a enzima(tampão A: Tris-HCl 30 mM pH 7,5) foi preparada com a utilização de uma etapa de precipitação em acetona seguida de ultrafiltração e diálise. O resultado de um ensaio em que injetou-se solução contendo a enzima até próximo a ruptura é apresentado na Figura 4.34.

Neste ensaio injetou-se na coluna cromatográfica(Pharmacia modelo 5/5; 0,5 cm de diâmetro; 3,2 cm de leito de resina; 0,3g de resina) 150 mL da solução contendo a enzima(atividade inicial $2,1 \text{ U.mL}^{-1}$; proteína inicial $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$; atividade específica igual a $17,2 \text{ U.mg}^{-1}$). A etapa de adsorção foi efetuada até que na saída do leito de resina observa-se a presença de β -Galactosidase($0,14 \text{ U.mL}^{-1}$). A etapa de lavagem(12 mL) foi realizada com o tampão A.

A eluição foi realizada com o tampão B(tampão A contendo 1 M NaCl) e tampão A, combinados de forma que se obtivesse primeiro um degrau("step") de concentração de 20% do tampão B no de eluição. Em seguida fez-se um gradiente até que fosse atingido 100% do tampão B.

Observa-se na Figura 4.34, que praticamente toda atividade da β -Galactosidase é eluida do leito com 20% do tampão B no tampão de eluição. As outras proteínas que não foram eluidas juntamente com a enzima o são quando o gradiente de sal possui cerca de 40% do Tampão B. Neste ensaio, tal como naqueles outros realizados anteriormente a β -Galactosidase foi eluida da resina com baixa força iônica.

As frações coletadas no pico de eluição correspondem a 88% da atividade injetada, correspondente à atividade específica de $25,6 \text{ U.mg}^{-1}$. Isto representou um fator de purificação de 1,5 vezes em relação àquela inicial. O eletroforetograma mostrou

resultados iguais aos obtidos anteriormente, isto é, quando fez-se somente ultrafiltração para preparar a solução contendo a enzima(Figura 4.18).

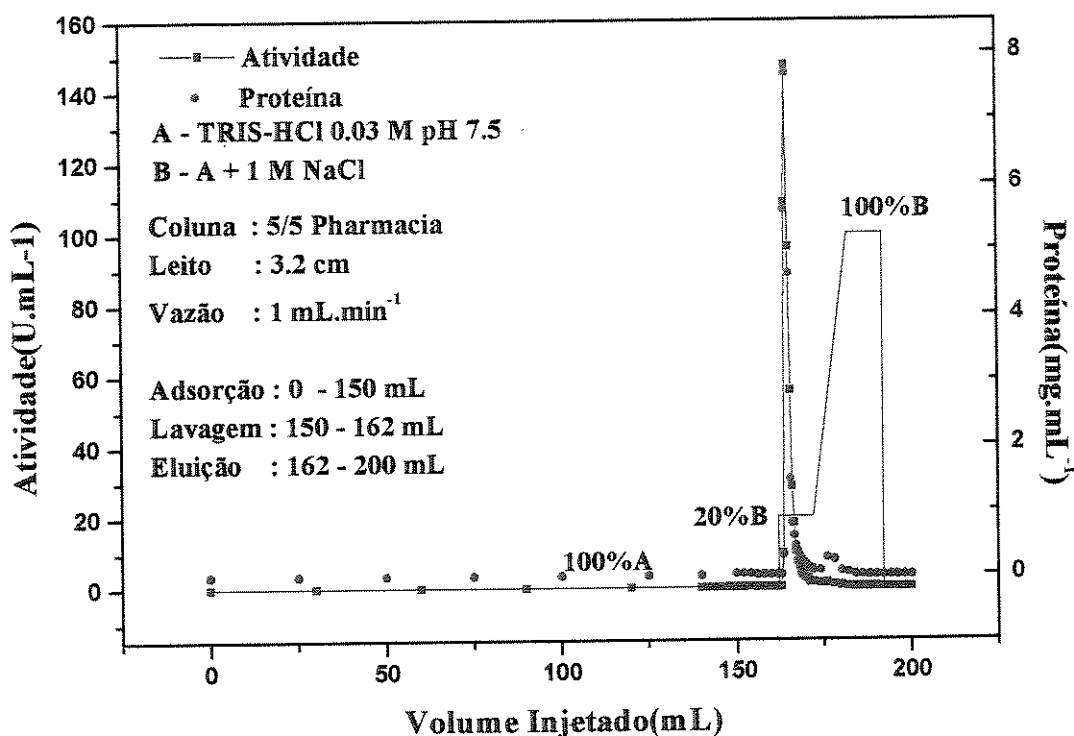


Figura 4.34 - Cromatograma de adsorção de β -Galactosidase em Accell Plus QMA; A – tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5; B - tampão A + 1 M NaCl; solução preparada com etapa de precipitação em acetona, ultrafiltração e diálise.

Um fato positivo a ser destacado, neste ensaio, foi o aumento da capacidade da resina, tanto para atividade adsorvida quanto para proteína total. Obteve-se, neste caso, as seguintes capacidades da resina, calculadas a partir da curva de ruptura: 1050 U.g⁻¹, referente a capacidade de atividade adsorvida; e 60 mg.g⁻¹ para a capacidade de proteína total. Essas capacidades são muito maiores que as obtidas anteriormente. Pode-se afirmar que as operações realizadas no preparo da solução (precipitação em acetona, ultrafiltração

e diálise), para remover substâncias tais como taninos e outros polifenóis, tem influência direta na capacidade da resina Accel Plus QMA.

4.11. Filtração em Gel

Foram realizados vários ensaios de filtração em gel, utilizando-se as frações coletadas em torno do pico de atividade obtido na eluição da enzima adsorvida no leito de resina, como mostrado nos diversos cromatogramas já apresentados.

Em todos os ensaios realizados as proteínas presentes na amostra, inclusive a enzima β -Galactosidase, passavam pela coluna e dela saíam todas juntas, produzindo um pico de base larga. Acredita-se que isto seja devido à interação das proteínas com os taninos e polifenóis presentes. Deve-se ressaltar que a amostra que contém a enzima, e que foi injetada na coluna de filtração em gel, era proveniente de um processo de concentração. Dessa forma, essas substâncias que interagem com as proteínas também estavam concentradas.

4.12. Modelagem da Adsorção em Tanque Agitado

4.12.1. Solução Numérica do Modelo

O balanço material na partícula do adsorvente é representado pela equação diferencial parcial,

$$\varepsilon_i \frac{\partial C_i}{\partial t} = \varepsilon_i D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{q_m k_d}{(k_d + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (4.5)$$

anteriormente apresentada, cuja condição inicial é:

$$t = 0 \quad C_i = 0 \quad (4.6)$$

e condições de contorno são :

No centro da partícula:

$$r = 0 \quad \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad (4.7)$$

Na superfície da partícula:

$$r = R \quad \varepsilon_i D_{ef} \left(\frac{\partial C_i}{\partial r} \right)_{|r=R} = k_f (C_b - C_i)_{|r=R} \quad (4.8)$$

Para a fase de líquido externa ao adsorvente,

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{3vk_f}{RV_i} (C_b - C_i)_{|r=R} \quad (4.9)$$

com a condição inicial:

$$t = 0 \quad C_b = C_0 \quad (4.10)$$

A solução numérica desse modelo, juntamente com os resultados experimentais de isotermas de adsorção e curvas cinéticas, permite obter os valores otimizados dos coeficientes k_f e D_{ef} .

Definindo-se as seguintes variáveis adimensionais:

$$x = \frac{r}{R} \quad \Theta_i = \frac{C_i}{C_0} \quad \Theta_b = \frac{C_b}{C_0} \quad \tau = \frac{t D_{ef}}{R^2} \quad B_{im} = \frac{k_f R}{\varepsilon_i D_{ef}} \quad (4.11)$$

que aplicados às equações do modelo acima resultam no modelo com equações adimensionalizadas:

$$\left[1 + \frac{q_m k_d}{\varepsilon_i (k_d + C_0 \Theta_i)^2}\right] \frac{\partial \Theta_i}{\partial \tau} = \left(\frac{\partial^2 \Theta_i}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial \Theta_i}{\partial x} \right) \quad (4.12)$$

$$\tau = 0 \quad \Theta_i = 0 \quad \forall x \quad (4.13)$$

$$x = 0 \quad \frac{\partial \Theta_i}{\partial x} = 0 \quad (4.14)$$

$$x = 1 \quad \frac{\partial \Theta_i}{\partial \tau} = B_{im} (\Theta_b - \Theta_i)_{|x=1} \quad (4.15)$$

$$\frac{d\Theta_b}{d\tau} = -\frac{3v}{V} B_{im} (\Theta_b - \Theta_i) \quad (4.16)$$

$$\tau = 0 \quad \Theta_b = 1 \quad (4.17)$$

O modelo acima (equações 4.12 a 4.17) pode se reduzido a um sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, DAE, usando-se o método de colocação ortogonal conforme FYNLAYSON(1980), VILLADSEN e MICHELSEN(1978), e YAO e TIEN(1992), NEVES(1995).

Aplicando-se, inicialmente, a transformação de variáveis $u=x^2$ às equações 4.12 e 4.14 do modelo acima, devido a condição de simetria, e discretizando a nova variável espacial u através do método da colocação ortogonal, tem-se:

$$\left[1 + \frac{q_m k_d}{\varepsilon_i (k_d + C_0 \Theta_{ij})^2}\right] \frac{d\Theta_{ij}}{d\tau} = 4u_j \sum_{k=1}^{N+1} \mathbf{B}_{jk} \Theta_{ik} + 6 \sum_{k=1}^{N+1} \mathbf{A}_{jk} \Theta_{ik} \quad (j = 1..N) \quad (4.18)$$

$$\tau = 0 \quad \Theta_{ik} = 0 \quad (k = 1..N+1) \quad (4.19)$$

$$u = 1 \quad \sum_{k=1}^{N+1} \mathbf{A}_{N+1,k} \Theta_{ik} = \frac{B_{im}}{2} (\Theta_b - \Theta_{i_{N+1}})_{|u=1} \quad (4.20)$$

Tabela 4.5 - Valores calculados para as constantes de associação(k_1) e de dissociação(k_2), referentes aos ensaios de adsorção em tanques agitados.

Cinética de Adsorção de Proteína			Cinética de Adsorção de Atividade		
C_0 (mg.mL ⁻¹)	k_1 (mL.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)	U_0 (U.mL ⁻¹)	k_1 (mL.U ⁻¹ .min ⁻¹)	k_2 (min ⁻¹)
1,070	1,39	0,0581	-	-	-
0,805	1,45	0,0604	-	-	-
0,535	3,32	0,139	-	-	-
0,175	32,66	0,529	2,00	1,97	0,031
0,130	66,81	1,082	1,50	1,97	0,031
0,087	31,67	0,513	1,00	1,97	0,031
0,148	2,81	0,113	2,50	0,14	0,008
0,104	3,68	0,148	1,75	0,20	0,012
0,076	3,68	0,148	1,25	0,23	0,013

1 - Material preparado com etapa de ultrafiltração.

2 - Material preparado com etapa de precipitação em acetona.

3 - Material preparado com etapas de precipitação em acetona e ultrafiltração.

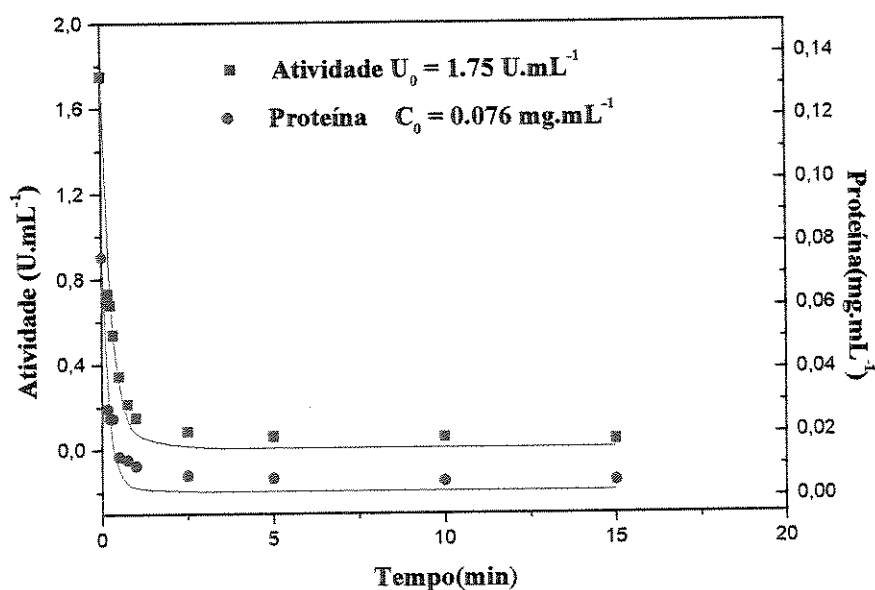


Figura 4.35 – Adsorção de proteína total e de atividade enzimática na resina trocadora de íons: comparação de valores experimentais e calculados através do modelo empírico.

4.12.2.2. Cálculo dos Parâmetros de Transferência de Massa

A adsorção tanto de proteínas como de β -Galactosidase, medida pela sua atividade, em Accell[®] Plus QMA, foram calculadas utilizando-se a solução numérica do modelo rigoroso, o qual leva em consideração a transferência de massa no filme de líquido(k_f), e a difusão nos poros da partícula de adsorvente(D_{ef}). Na Tabela 4.6 apresenta-se os dados calculados para os referidos parâmetros de transferência de massa.

Observa-se, na Tabela 4.6, que tanto o coeficiente de transferência de massa no filme como o de difusão nos poros diminuem com o aumento da concentração inicial de proteína total em solução. Esse mesmo comportamento foi observado por ARAÚJO(1996), para a adsorção de BSA no mesmo adsorvente(Accell[®] Plus QMA). Verificou-se, analisando os dados de ARAÚJO(1996), que a variação do coeficiente de difusão nos poros, e também a transferência de massa no filme, são explicadas através de um modelo exponencial.

A ordem de grandeza dos valores calculados para o coeficiente de difusão nos poros(D_{ef}), e, ainda a dos coeficientes de transferência de massa no filme, são maiores ou iguais àqueles obtidos por ARAÚJO(1996).

Essa variação com a concentração inicial, nos parâmetros de transferência de massa não é observada, de forma significativa, quando utiliza-se os dados das curvas cinéticas de adsorção de atividade enzimática para calculá-los. Os valores calculados, para esses parâmetros são, geralmente, menores que os obtidos utilizando-se os dados de adsorção de proteína, como pode ser observado na Tabela 4.6. Esses dados sugerem que uma maior quantidade de outras proteínas são transferidas no filme e difundem-se nos poros do adsorvente, em comparação com a β -Galactosidase que também está em solução.

O processo de adsorção pode ser considerado, de fato, como uma série de passos. Em baixas concentrações iniciais de adsorvato, a adsorção não está em níveis de

capacidade máxima do adsorvente, e assim o mecanismo de interação é, provavelmente, menos complexo. Em concentrações elevadas de proteína, por outro lado, o sistema está próximo à capacidade máxima do adsorvente. Dessa forma, efeitos de não-equilíbrio, tal como interação de proteína-proteína, e outros efeitos não-ideais tal como impedimento(obstrução) estérica podem ser muito significativos. Isso pode justificar a diminuição do valor de D_{ef} e de k_f com o aumento da concentração inicial de proteína(HABBABA e ÜLGEN,1997). Além disso, em sistemas compostos por substâncias provenientes de extratos de plantas, e de cultivo em substrato sólido, a presença de polifenóis, que interagem com as proteínas, podem provocar efeitos difíceis de serem quantificados.

Deve-se lembrar que no caso do modelo empírico, anteriormente utilizado para calcular a constante de associação(k_I), engloba, de fato, as resistências à transferência de massa no filme e nos poros.

Na Figura 4.36 estão alguns resultados dos ajustes do modelo empírico aos dados experimentais, relativos à adsorção de proteína total e de atividade enzimática (ensaio em tanques agitados). Verifica-se, nesta figura, que o modelo ajusta-se bem aos dados experimentais.

Observou-se que a solução numérica do modelo com transferência de massa no filme e difusão nos poros do adsorvente fornecia bons resultados a partir de $N=2$ pontos internos de colocação ortogonal, com $\alpha=\beta=0$. Outros valores para α e β também foram testados, e os resultados obtidos eram muito próximos.

A escolha da rotina DASSL para resolver o sistema o de equações diferenciais e algébricas foi importante. Nesta rotina, pode-se estabelecer uma restrição que evita valores negativos para a variável dependente ao longo do tempo de integração numérica do sistema de equações. Esses valores apareceram, principalmente, nos primeiros minutos, durante a solução do sistema de equações.

Tabela 4.6 - Valores calculados para os coeficientes de transferência de massa no filme de líquido(k_f) e difusão nos poros do adsorvente(D_{ef}), referentes aos ensaios de adsorção em tanques agitados.

Cinética de Adsorção de Proteína			Cinética de Adsorção de Atividade		
C_0 (mg.mL ⁻¹)	$D_{ef} \times 10^9$ (m ² .min ⁻¹)	$k_f \times 10^2$ (m.min ⁻¹)	U_0 (U.mL ⁻¹)	$D_{ef} \times 10^9$ (m ² .min ⁻¹)	$k_f \times 10^2$ (m.min ⁻¹)
1,070	1,40	1,52	-	-	-
0,805	1,22	1,30	-	-	-
0,535	3,25	3,43	-	-	-
0,175	6,93	7,33	2,00	7,86	2,09
0,130	7,78	8,97	1,50	3,83	1,07
0,087	17,12	18,26	1,00	3,68	1,17
0,148	0,57	0,65	2,50	0,31	0,69
0,104	53,67	66,07	1,75	0,43	0,62
0,076	69,14	73,06	1,25	0,47	0,87

1 - Material preparado com etapa de ultrafiltração.

2 - Material preparado com etapa de precipitação em acetona.

3 - Material preparado com etapas de precipitação em acetona e ultrafiltração.

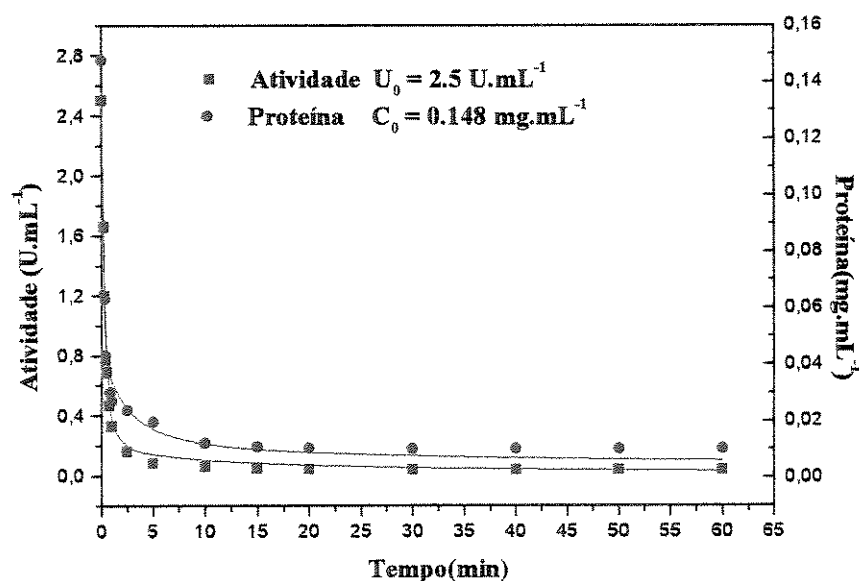


Figura 4.36 - Adsorção de proteína total e de atividade da enzima na resina trocadora de íons: comparação de valores experimentais e calculados através do modelo rigoroso.

em que **A** e **B** são as matrizes de colocação ortogonal. Há N pontos de colocação no intervalo $0 < u < 1$ ($j=1..N$), e um ponto em $u_{N+1}=1$. O ponto $u=0$ não é incluído porque a condição de simetria requer que a primeira derivada seja zero neste ponto, e esta condição é automaticamente satisfeita a partir da transformação de variável $u=x^2$; a variável dependente é função somente de $u=x^2$.

A solução deste sistema (equações 4.18 a 4.20), juntamente com as equações da fase externa no tanque agitado (equações 4.16 e 4.17) foram resolvidas simultaneamente, utilizando-se o método BDF (Backward Differentiation Formulas, Implicit Differential Systems), PETZOLD (1982), PETZOLD (1983), BRENAN (1996), implementado na rotina DASSL (A Differential/Algebraic System Solver, de domínio público), desenvolvida por PETZOLD (1982). Os valores ótimos dos coeficientes k_f e D_{ef} , para as curvas cinéticas, foram obtidos pela aplicação do método de otimização não-linear multivariável proposto por BOX (1965). Essas duas rotinas foram implementadas num programa computacional em linguagem Fortran.

4.12.2. Resultados da Modelagem da Adsorção em Tanque Agitado

Os dados coletados nos ensaios de adsorção de proteína total e de atividade da enzima β -Galactosidase, em tanques agitados, foram utilizados para o cálculo de parâmetros relacionados tanto com a reação proteína-adsorvente como aqueles referentes à transferência de massa.

4.12.2.1. Cálculo das Constantes de Associação e de Dissociação

A adsorção tanto de proteínas como de β -Galactosidase (medida pela sua atividade) em Accell® Plus QMA, foram calculadas utilizando-se a solução analítica do modelo das taxas - um modelo empírico (equação 2.8). Nesse modelo, um único parâmetro é desconhecido, ou seja, uma constante (k_1) relacionada com a taxa de associação de

proteínas, ou de atividade da enzima, com a resina. Na Tabela 4.5 os resultados são apresentados para cada uma das formas de preparo da solução contendo a β -Galactosidase, bem como para cada concentração inicial de proteína e de atividade enzimática.

Os valores da constante de associação de proteína(k_1), com a resina Accell® Plus QMA, são numericamente maiores(de uma a duas ordens de grandeza) que os obtidos por CRUZ(1997), para a adsorção de Insulina nessa mesma resina. Além disso, os valores da constante de dissociação(k_2) também são de uma a duas ordem de grandeza maiores.

Os valores da constante de associação(k_1) para o material preparado com etapa de precipitação em acetona são elevados, quando comparados a outros valores observados para a adsorção de proteínas puras em trocadores iônicos. HABBABA e ÜLGEN(1997), obtiveram o valor $k_1=0,804 \text{ mL.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $k_1=15,7 \text{ mL.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para as concentrações $C_0=0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $C_0=1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente, para a adsorção de BSA no trocador iônico DE52. Concluíram que a constante de associação varia significativamente com a concentração inicial de proteína em solução.

Observa-se na Tabela 4.5, que os valores calculados para constante de associação utilizando-se os dados de atividade enzimática, são menores que aqueles calculados utilizando-se os dados de adsorção de proteína(uma ordem de grandeza). Esses dados sugerem que a cinética de associação de outras proteínas presentes em solução é maior que aquela referente à enzima β -Galactosidase.

Na Figura 4.35 estão alguns resultados dos ajustes do modelo empírico aos dados experimentais, relativos à adsorção de proteína total e de atividade enzimática (ensaios em tanques agitados). Verifica-se, nesta figura, que o modelo ajusta-se bem aos dados experimentais.

4.13. Modelagem da Adsorção em Coluna Cromatográfica

4.13.1. Solução Numérica do Modelo

O balanço material na coluna cromatográfica empacotada com o adsorvente é representada pela equação diferencial parcial,

$$\varepsilon_e \frac{\partial C_e}{\partial t} = \varepsilon_e D_a \frac{\partial^2 C_e}{\partial z^2} - v_s \frac{\partial C_e}{\partial z} - \frac{3k_L}{R} (1 - \varepsilon_e) (C_e - \bar{C}_i) \quad (4.21)$$

com as condições de contorno:

Na entrada da coluna, em $z=0$

$$v_s C_0 = v_s (C_e)_{|z=0} - D_a \left(\frac{\partial C_e}{\partial z} \right)_{|z=0} \quad (4.22)$$

Na saída da coluna, em $z = Z$

$$\left(\frac{\partial C_e}{\partial z} \right)_{|z=Z} = 0 \quad t > 0 \quad (4.23)$$

A condição inicial é:

$$t = 0 \quad C_e = 0 \quad (4.24)$$

Para a partícula de adsorvente,

$$\varepsilon_i \frac{d\bar{C}_i}{dt} = \frac{3k_L}{R} (C_e - \bar{C}_i) - \frac{dq_i}{dt} \quad (4.25)$$

em que

$$\frac{dq_i}{dt} = f'(\bar{C}_i) \frac{d\bar{C}_i}{dt} \quad (4.26)$$

com a seguinte condição inicial:

$$t = 0 \quad \bar{C}_i = 0 \quad (4.27)$$

A solução numérica desse modelo, juntamente com os resultados experimentais de isotermas de adsorção e curvas de ruptura, permite obter os valores otimizados dos coeficientes k_f e D_{ef} .

Definindo-se as seguintes variáveis adimensionais:

$$\Phi = \frac{C_e}{C_0} \quad Y = \frac{z}{Z} \quad \Theta = \frac{\bar{C}_i}{C_0} \quad P_e = \frac{Zv_s}{\varepsilon_e D_a} \quad N_u = \frac{k_L Z^2}{R D_a} \quad \tau = \frac{t D_a}{Z^2} \quad \Psi = \frac{1 - \varepsilon_e}{\varepsilon_e} \quad (4.28)$$

que aplicadas ao modelo acima resultam no modelo com equações adimensionalizadas para a fase de líquido externa:

$$\frac{\partial \Phi}{\partial \tau} + P_e \frac{\partial \Phi}{\partial Y} - \frac{\partial^2 \Phi}{\partial Y^2} = -3\Psi N_u (\Phi - \Theta) \quad (4.29)$$

$$\left(\frac{\partial \Phi}{\partial Y} \right)_{|Y=0} = P_e (\Phi - 1) \quad (4.30)$$

$$\left(\frac{\partial \Phi}{\partial Y} \right)_{|Y=1} = 0 \quad (4.31)$$

$$\tau = 0 \quad \Phi = 0 \quad \Theta = 0 \quad \forall Y \quad (4.32)$$

e para a fase de sólido(resina):

$$\frac{\partial \Theta}{\partial \tau} = \frac{3N_u}{[\varepsilon_i + (f'(\Theta))]} (\Phi - \Theta) \quad (4.33)$$

em que

$$f'(\Theta) = \frac{q_m k_d}{[k_d + \Theta C_0]^2} \quad (4.34)$$

com a condição inicial

$$\tau = 0 \quad \Theta = 0 \quad (4.35)$$

O modelo acima, equações 4.29 a 4.31, pode se reduzido a um sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, DAE, usando-se o método da colocação ortogonal, conforme FINLAYSON(1980), VILLADSEN e MICHELSEN(1978). Assim, discretizando-se a variável espacial Y da equação 4.29, através do método da colocação ortogonal obtém-se:

$$\frac{d\Phi_j}{d\tau} = \sum_{k=1}^{N+2} B_{jk} \Phi_k - P_e \sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \Phi_k - 3\psi N_u (\Phi_j - \Theta_j) \quad (j=2..N) \quad (4.36)$$

que representa as equações diferenciais ordinárias nos pontos de colocação ($j=2..N$) internos ao domínio $0 \leq Y \leq 1$. Aplicando-se o método da colocação às condições de contorno (equações 4.30 e 4.31) resulta:

$$\sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \Phi_k = P_e (\Phi_j - 1) \quad (j=1) \quad (4.37)$$

e,

$$\sum_{k=1}^{N+2} A_{jk} \Phi_k = 0 \quad (j=N+2) \quad (4.38)$$

A condição inicial é:

$$\tau = 0 \quad \Phi_j = 0 \quad \Theta_j = 0 \quad (j=1..N+2) \quad (4.39)$$

As equações para a fase de sólido ficam:

$$\frac{\partial \Theta_j}{\partial \tau} = \frac{3N_u}{\left[\epsilon_i + f'(\Theta_j) \right]} (\Phi_j - \Theta_j) \quad (4.40)$$

em que

$$f'(\Theta_j) = \frac{q_m k_d}{[k_d + \Theta_j C_0]^2} \quad (4.41)$$

com a condição inicial

$$\tau = 0 \quad \Theta_j = 0 \quad (4.42)$$

A solução do sistema de equações diferenciais ordinárias e algébricas, formado pelas equações 4.36 a 4.38, juntamente com as equações 4.39, 4.40 correspondentes à fase de sólido, foram resolvidos simultaneamente, utilizando-se o método BDF (Backward Differentiation Formulas, Implicit Differential Systems), PETZOLD(1982), PETZOLD(1983), BRENAN et al.(1996), implementado na rotina DASSL (A Differential/Algebraic System Solver, de domínio público), desenvolvida por PETZOLD(1982). Os valores ótimos dos coeficientes k_L e D_a , para curvas experimentais de ruptura, foram obtidos pela aplicação do método de otimização não-linear multivariável proposto por BOX(1965). Essas duas rotinas foram implementadas num programa computacional em linguagem Fortran.

4.13.2. Resultado da Solução Numérica do Modelo de Adsorção em Coluna Cromatográfica

Na Figura 4.36 são mostrados os dados experimentais e calculados através do modelo de adsorção em coluna cromatográfica. Observa-se na Figura 4.36 que o modelo representa razoavelmente bem a curva de ruptura. Deve-se notar, no entanto, que os dados experimentais tem um comportamento ascendente muito rápido a partir do ponto de ruptura("breakthrough"), e que este comportamento não é realmente representado pelo modelo.

O ajuste do traçado de uma curva de ruptura é uma tarefa delicada, à medida que os algoritmos de solução do modelo encontram dificuldades em lidar com as tentativas de manipular as derivadas dq/dC ao longo da isoterma, já que a solução do modelo numérico

depende diretamente dessa derivada e indiretamente da função que representa a isoterma (QUADRI et al., 1998). Em se tratando de dados experimentais obtidos de uma mistura de substâncias que competem pelo sítio de adsorção, e que o fenômeno "roll-up" seguramente está presente durante a adsorção em coluna, a tarefa é ainda mais complexa.

Os valores dos parâmetros de transferência de massa obtidos através da otimização, para os dados mostrados na Figura 4.37, foram $D_a = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ para o coeficiente de dispersão axial, e $k_L = 5,7 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ para o coeficiente de transferência de massa. O valor do coeficiente de dispersão, D_a , tem ordem de grandeza maior que aqueles que poderiam ser estimados através de correlações apresentadas por CARRÈRE (1993), e GEANKOPLIS (1983). Por outro lado, o coeficiente de transferência de massa tem a mesma ordem de grandeza daqueles que poderiam ser estimados através das correlações apresentadas pelos autores supra citados.

A solução numérica do modelo de adsorção em coluna cromatográfica foi efetuada partindo-se de $N=5$ pontos internos de colocação ortogonal, com $\alpha=\beta=0$.

4.13.3. Resultado do Modelo de Thomas para a Adsorção em Coluna Cromatográfica

Calculou-se a concentração adimensional de atividade na saída da coluna cromatográfica, através do modelo de Thomas. O resultado é mostrado na Figura 4.37, juntamente com o resultado do cálculo efetuado através da solução numérica do modelo com dispersão axial.

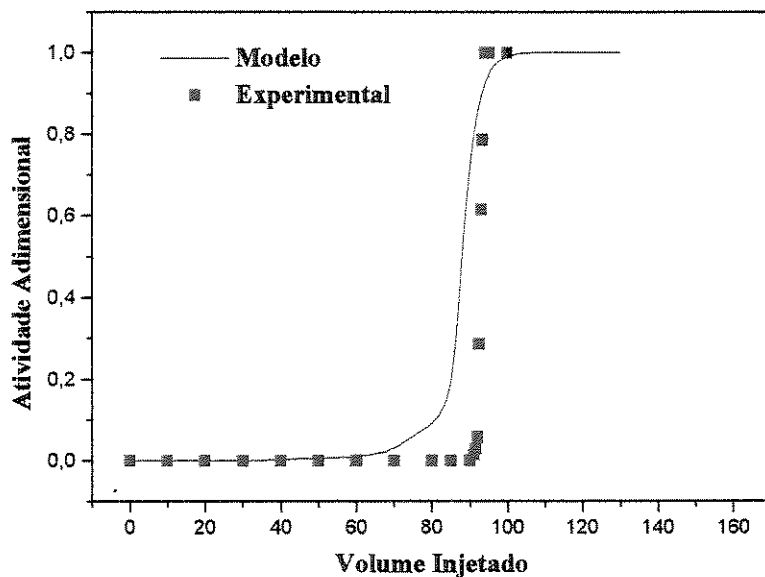


Figura 4.37 - Curvas de ruptura - comparação entre resultados experimentais e calculados através do modelo com dispersão axial.

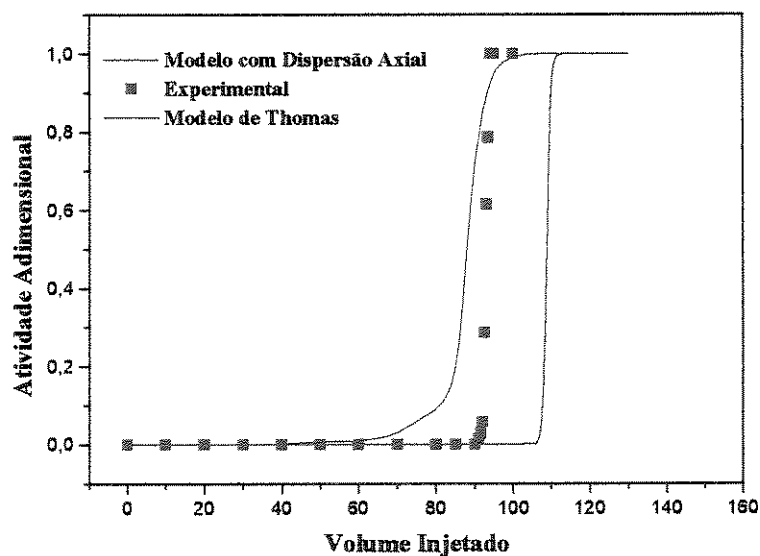


Figura 4.37 - Comparação de resultados experimentais e calculados através da solução numérica do modelo com dispersão axial e do modelo de Thomas.

Observa-se, nessa figura, que o modelo de Thomas começa a fornecer valores maiores que zero, para a atividade na saída da coluna, a partir de 107 minutos, enquanto os dados experimentais são maiores que zero a partir de 91 minutos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5.1. Conclusões

Com base nos resultados obtidos pode-se fazer as seguintes conclusões:

1. A presença de polifenóis, no extrato bruto produzido pelo fungo *Scopulariopsis sp.*, dificultou o processo de concentração e purificação da enzima β -Galactosidase;
2. A ultrafiltração de soluções, preparadas a partir do extrato bruto, removeu, parcialmente, os polifenóis presentes, e permitiu a adsorção da enzima na resina de troca iônica aniônica Accel[®] Plus QMA;
3. A precipitação em acetona removeu, parcialmente, polifenóis, e outras substâncias que adsorviam irreversivelmente, permitiu a adsorção da enzima na resina, porém a capacidade da mesma ficou reduzida, em comparação com os resultados obtidos com soluções que sofreram operação de ultrafiltração;

4. A combinação das operações de precipitação em acetona e ultrafiltração não melhorou a capacidade da resina, em comparação com os resultados obtidos quando utilizou-se apenas a ultrafiltração;

5. A combinação das operações de precipitação em acetona, ultrafiltração e diálise aumentou a capacidade de adsorção da resina, em comparação com os resultados obtidos quando utilizou-se as outras formas de preparo da solução contendo a enzima;

6. Os polifenóis competem pelos sítios de adsorção na resina com as proteínas presentes nas soluções preparadas a partir do extrato bruto, e o resultado dessa competição ficou explícito nas isotermas de adsorção de atividade da enzima;

7. O modelo de Langmuir explica as isotermas de adsorção das proteínas presentes no extrato bruto;

8. O modelo de Langmuir explica somente uma parte da isoterma de adsorção de atividade da enzima, devido a competição entre proteínas e polifenóis pelos sítios de adsorção na resina;

9. Observou-se o fenômeno denominado "roll-up" na adsorção em coluna cromatográfica, e isto dificultou a obtenção de curvas de ruptura;

10. A enzima β -Galactosidase foi parcialmente purificada, conseguindo-se um fator de purificação de 3,3 vezes num dos ensaios;

11. O valor da constante de associação, k_1 , calculado a partir das curvas cinéticas, foi da ordem de grandeza daqueles calculados para substâncias puras;

12. O coeficiente de transferência de massa no filme, k_f , e o coeficiente de difusão nos poros, D_{ef} , calculados com base nas curvas cinéticas, foram maiores que os observados para BSA na mesma resina;

13. O coeficiente de dispersão axial, D_a , e o coeficiente de transferência de massa, k_L , na coluna, são maiores que aqueles que poderiam ser calculados através de correlações empíricas;

5.2. Sugestões Para Trabalhos Futuros

1. Produzir a enzima β -Galactosidase num outro tipo de substrato sólido, por exemplo o bagaço de cana, que contenha menor quantidade de polifenóis;
2. Utilizar substâncias que podem remover polifenóis, tais como PVP(polivinilpirrolidona), PVPP(polivinilpolipirrolidona), e Amberlite, no preparo de soluções contendo a β -Galactosidase e destinadas aos estudos de adsorção em resinas trocadoras de íons;
3. Estudar a discretização dos modelos de adsorção em tanque agitado e em coluna cromatográfica utilizando-se do método da colocação ortogonal em elementos finitos.
4. Estudar a discretização dos modelos de adsorção em tanque agitado e em coluna cromatográfica utilizando-se do método dos volumes finitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, M. O. D., **Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons**. Campinas:FEQ, Unicamp, 1996. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- ARECES, L.B.; BISCOGLIO de JIMÉNEZ BONINO, M.J.; PARRY, M.A.A; FRAILE, E.R.; FERNÁNDEZ, H.M.; CASCONE, A., Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*, **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 37, p. 283-294, 1993.
- ANDREWS, P.K., LI, S., Partial purification and characterization of β -Galactosidase from sweet cherry, a nonclimacteric fruit, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 2177-2182, 1994.
- ARNOLD, F.H., BLANCH, H.W., WILKE, C.R., Liquid chromatography plate height equations, **Journal of Chromatography**, v. 330, p. 159-166, 1985.
- ARTOLOZAGA, M.J., JONAS, R., SCHNEIDER, A.L., FURLAN, S.A, CARVALHO-JONAS, M.F., One step partial purification of β -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 using STRAMLIN-DEAE, **Bioseparations**, v.7, p. 137-143, 1998.

- ARVE, B.H., LIAPIS, A.I., Modeling and analysis of biospecific adsorption in a finite bath, **AIChE Journal**, v. 33, n. 2, p. 179-193, 1987.
- BELTER, P.A, CUSLER, E.E.L. e HU, W.S. **Bioseparations: Downstream processing for biotechnology**, Wiley Interscience Publications, New York, 1988, 368p.
- BIO-RAD LABORATORIES, **Mini-Protein® Electrophoresis Cell: Instruction manual**, Bio-Rad Laboratories, California, 1998.
- BOX, P., A new method of constrained optimization and a comparison with other methods, **Computer Journal**, vol. 8, p. 42-52, 1965.
- BOYER, P.M., HSU, J.T., Effects of ligand concentration on protein adsorption in dye-ligand adsorbents, **Chemical Engineering Science**, v. 47, n.1, p. 241-251, 1992.
- BRADFORD, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- BRASH, J.L. The fate of fibrinogen following adsorption at the blood-biomaterial interface. In: Blood with contact with natural and artificial surfaces, 1987, New York. **Annals of The New York Academy of Sciences**. New York: New York Academy of Sciences, 1987. v. 516, p. 206-222.
- BRENAN, K.E., CAMPBELL, S.L. e PETZOLD, L.R., **Numerical solution of initial-value problems in differential-algebraic equations**, SIAM, Philadelphia, 1996, 256p.
- CARRÈRE, H., **Extraction des Proteines du Lactosérum par Chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé**. Toulouse:INPT, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1993, Thèse(Doctorat)- Institut National Polytechnique de Toulouse, 1993.
- CHANG, Y.K., CHASE, H.A. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 512-526, 1996.

- CHASE, H.A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds, **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 296-303, 1994.
- CHASE, H.A., Prediction of the performance of preparative affinity chromatography, **Journal of Chromatography**, v. 297, p. 179-202, 1990.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. e BONATO, P.S., **Introdução a métodos cromatográficos**, Editora da Unicamp, Campinas, 1990, 279p.
- CRUZ, J. M. **Adsorção de insulina em resina trocadora de íons utilizando leitos fixos e expandidos**. Campinas:FEQ, Unicamp, 1997. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- DRAEGER, N.M.; CHASE, H.A. Protein Adsorption in Liquid Fluidized Beds - Advances in Separation Processes I., **Chemical Engineering Symposium Series**, v. 118, p. 161- 172, 1990.
- DUNN, M.J., **Determination of total protein concentration**, In: HARRIS, E.L., ANGAL, S., Protein purification methods: a practical approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1995, p. 10-40, 1995.
- DUTTA, P. e MAJUMDER, G.C., Purification and characterization of rat epididymal neutral β -galactosidase and its changes during in vivo development, **Biochemistry Cell Biology**, v. 71, p. 22-26, 1993.
- FERNÁNDEZ-LAHOPE, H.M., FRAILE, E.R., CASCONO, O., Acid protease recovery from solid-state fermentation system, **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 83-93, 1998.
- FINLAYSON, B.A., **Nonlinear analysis in chemical engineering**, McGraw-Hill, New York, 1980.
- FIROUZTALE, E., MAIKNER, J.J., DEISSLER, K.C. e CARTIER, P.G., Validation of a theoretical model for adsorption using cephalosporin C and polymeric reversed phase resins, **Journal of Chromatography A**, v. 658, p. 361-370, 1994.

- FIROUZTALE, E., SCOTT, A.P., DALVIE, S.K., e BLOHN, G.M., Experimental and theoretical study of key parameters of adsorption on reverse phase macroporous resins, In: New developments in bioseparations, **AIChE Symposium Series**, v. 88, n. 290, p. 25-33, 1992.
- FISCHER, L., SCHECKERMANN, C. e WAGNER, F., Purification and characterization of a thermotolerant β -galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p.1497-1501, 1995.
- FREJ, A.K., HJORTH, R. e HAMMARTOM, A., Pilot scale recovery of recombinante annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 922-929, 1994.
- FURUSAWA, T., SUZUKI, M., SMITH, J.M., Rate Parameters in heterogeneous catalysis by pulse techniques, **Catal. Ver.-Sci. Eng.**, v. 13, n. 1, p. 43-76, 1976.
- GEANKOPLIS, C.J., **Transport processes and unit operations**, Prentice Hall International Editions, New Jersey, 1993, 921p.
- GEGENHEIMER, P., Preparations of extracts from plants, In: DEUTSCHER, M.P., **Methods in Enzymology**, v. 182, Academic Press, New York, p. 174-193, 1990.
- HABBABA, M.M., ÜLGEN, K.Ö., Analysis of protein adsorption to ion exchangers in a finite bath, **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 69, p. 405-414, 1997.
- HANSSON, M., STAHL, S., HJORTH, R. UHLEN, M. e MOKS, T., Single-step recovery of a secreted recombinant protein by expanded bed adsorption, **Bio/Technology**, v. 12, p. 285-288, 1994.
- HARRIS, E.L., ANGAL, S., **Protein purification methods: a pratical approach**, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1995, 317p.
- HARRIS, E.L., **Purification Strategy**, In: HARRIS, E.L., ANGAL, S., Protein purification methods: a pratical approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1995, p51-64, 1995.

- HASLAM, E., Polyphenols-protein interactions, **Biochemistry Journal**, v. 139, p. 285-288, 1974.
- HORSTMANN, B.J.; CHASE, H.A. Modelling the Affinity Adsorption of Immunoglobulin G to Protein A Immobilised to Agarose Matrices, **Chemical Engineering Research Development**, v. 67, n. 3, p. 243-254, 1989.
- JACOBSON, J.M. Determination of competitive adsorption isotherms for modeling large-scale separations in liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 499, p. 5-19, 1990.
- JAMES, E. A., **The application of multicomponent adsorption theory to an ion exchange chromatography system for recovery of whey proteins**. Brisbane:DCE, The University of Queensland, 1994. Thesis(PhD)- Departament of Chemical Engineering, The University of Queensland Australia, 1994, 125p.
- JAMES, D.H. e PHILLIPS, C.S.G., The chromatography of gases and vapors - III, The determination of adsorption isotherms, **Journal of Chemical Society**, p. 1066-1070, 1953.
- JOOD, S., KAPOOR, A.C., SINGH, R., Polyphenol and phytic acid contents of cereal grains as affected by insect infestation, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 435-438, 1995.
- KAPOOR, A., YANG, R.T., Roll-up in fixed bed, multicomponent adsorption under pore diffusion limitation, **AIChE Journal**, v. 33, p. 1215-1217, 1987.
- KILARA, A., SHAHANI, K.M., Enzymes in food technology, In: BLANCH, H.W., DREW, S., WANG, D.I.C., **Comprehensive biotechnology - The principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**, v. 3, **The practice of biotechnology**, Pergamon Press, Oxford, England, p. 1045-1064, 1985.
- KUNII, D., LEVENSPIEL, O., **Fluidization Engineering**, R.E. Krieger Publishing Co., New York, 1977.

- KRISHNASWAMY, P.R., GANAPATHY, R. e SHEMILT, L.W., Correlating parameters for axial dispersion in liquid fluidized systems, **Canadian Journal Chemical Engineering**, v. 56, p. 550-553, 1978.
- LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, **Nature**, v. 227, 680-685, 1970.
- LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquid, **Journal of American Chemical Society**, v. 30, p. 2263-2295, 1916.
- LEVENSPIEL, O., **Engenharia das Reações Químicas**, 2ª Edição, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1974, p. 207-215.
- LIAPIS, A.I., McCOY, M.A., Theory of perfusion chromatography, **Journal of Chromatography**, v. 599, p. 87-104, 1992.
- LIAPIS, A.I., RIPPIN, D.W.T., The simulation of binary adsorption in activated carbon columns using estimates diffusion resistance within the carbon particles derived from batch experiments, **Chemical Engineering Science**, v. 33, p. 594-600, 1978.
- LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., Exoenzymes, In: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E., **Solid substrate cultivation**, Elsevier, London, p. 191-209, 1992.
- LONSANE, B.K., KRIAHNAIAH, M.M., Product leaching and downstream processing, In: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E., **Solid substrate cultivation**, Elsevier, London, p. 1-16, 1992.
- LOOMIS, W.D., Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles, In: FLEISHER, S., PACKER, L., **Methods in Enzymology**, v. 31, Academic Press, New York, p. 528-545, 1974.
- LOOMIS, W.D., Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes, **Methods in Enzymology**, v. 13, Academic Press, New York, p. 528-545, 1969.
- LOWRY, O. H. et al "Protein measurement with the Folin phenol reagent, **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

- MACPHERSON, J.M., KHACHATOURIANS, G.G., Partial purification and characterization of β -Galactosidase produced by *Beauveria Bassiana*, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 13, p. 217-230, 1991.
- MITCHELL, D.A., LONSANE, B.K., Definitions characteristics and potential, In: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E., **Solid substrate cultivation**, Elsevier, London, p. 1-16, 1992.
- MITCHELL, D.A., TORGONSKI, Z., ROGALSKI, A., LEONOWICZ, A., Substrates for process, In: DOELLE, H.W., MITCHELL, D.A., ROLZ, C.E., **Solid substrate cultivation**, Elsevier, London, p. 1-16, 1992.
- MORRISSEY, J.H., Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity, **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981.
- NAKANISHI, K., YAMAMOTO, S., MATSUNO, R., KAMIKUBO, T. Analysis of dispersion mechanism in gel chromatography, **Agricultural Biology Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1465-1473, 1977.
- NEVES, S.B., **Modelagem de um leito fixo de adsorção para sistemas líquido-sólido**. Salvador:UFBA, UFBA, 1995. Dissertação(Mestrado)- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, 130 p., 1995.
- NICOUD, R.M. e PERRUT, M., Chromatographie d'élution frontale ou lit mobile simulé, **Informations Chimie**, v. 328, p. 250-255, 1991.
- NOVO NORDISK, A ação das enzimas, Novo Nordisk A/S, Dinamarca, 1992, 51p.
- OH, H.I., HOFF, J.E., ARMSTRONG, G.S., HAFF, A.L. Hydrophobic interactions in tannin-protein complexes, **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 28, p. 394-398, 1980.
- PAPAMICHAEL, M., HUSTEDT, H., **Adsorptive recovery of intracellular enzymes using expanded beds**, GBF(Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) Scientific Report, Braunschweig, 1993.

- PARK, Y.K., De SANTI, S.S., e PASTORE, G.M., Produstion and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, **Journal of Food Science**, v. 44, n. 1, p. 100-103, 1979.
- PASTORE, G.M., e PARK, Y.K., Purification and characterization of β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp., **Journal of Fermentation Technology**, v.58, n. 1, p. 79-81, 1980.
- PASTORE, G.M., **Produção, purificação, estudo das propriedades e aplicação da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.**, Campinas:FEA, Unicamp, 1982. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1982.
- PETZOLD, L.R. , A description of DASSL: a diferencial/algebraic system solver, in: **Scientific Computing**, R.S. Steplaman et al., eds, North-Holland, Amsterdam, p. 65-68, 1983.
- PETZOLD, L.R., A description of DASSL: a differential/algebraic system solver, Livemore, Sandia National Laboratories, Report SAND82-8637, 1982.
- PHARMCIA BIOTECH, **Calibrations kits for molecular weight determination using electrophoresis**, Amersham Pharamacia Biotech, Uppsala, Sweden, 1998.
- PHARMCIA BIOTECH, **Ion exchange chromatography - Principles and methods**, Amersham Pharamacia Biotech, Uppsala, Sweden, 1996.
- PHARMCIA BIOTECH, **Fast Coomassie staining development technique**, File N° 200, Amersham Pharamacia Biotech, Uppsala, Sweden, 1991.
- PISANI, M., RELLEA, R., RAIA, C.A., et al., Thermostable β -galactosidase from the archaebacterium *Sulfolobus solfataricus* - purification and properties, **European Journal Biochemistry**, v. 187, p. 321-328, 1990.
- PRICE, M.L., BUTLER, L.G., Rapid visual estimation and espectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

- QUADRI, M.B., CRUZ, J.M., SANTANA, C.C., Modelagem numérica do processo de adsorção em coluna da insulina sobre a resina Accel® Plus, In: IIº ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, 1998, Florianópolis, Santa Catarina. **Anais do IIº Encontro Brasileiro Sobre Adsorção**.(no prelo)
- RAMAKRISHNA, S.V., SUEELA, T., GHYLDYAL, N.P., JALEEL, S.A., PREMA, P., LONSANE, B.K., AHMED, S.Y., Recovery of amyloglucosidase from moldy bran, **Indian Journal Technology**., v. 20, p. 476-480, 1982.
- RAMAMURTHY, V., KOTHARI, R.M., Comparasion of fungal protease production by submerged and surface cultivation, **Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 349-354, 1993.
- RHEE, H.K. e AMUNDSON, N.R. Shock layer in two solute chromatography: Effect of axial dispersion and mass transfer, **Chemical Engineering Science**, n. 29, p. 2049, 1974.
- RICHARDSON, J.F., e ZAKI, W.N., Sedimentation and fluidization, **Transactions Institute Chemical Engineering**, v. 32, p. 35-53, 1954.
- RICHMOND, M.L. e STINE, C.M., β -galactosidase: review of recent research related to technological applications, nutritional concerns, and immobilization, **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 9, p. 1579 - 1771, 1981.
- ROE, S., **Separation based on structure**, In: HARRIS, E.L., ANGAL, S., Protein purification methods: a pratical approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1995, p. 175-244, 1995.
- SALUNKHE, D.K., JADHAV, S.J., KADAN, S.S., CHAVAN, J.K., Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenos in cereal and legumes, **CRC Critical Reviews in food science and nutrition**, v. 17, n. 3, 1981.
- SANTACESARIA, E. , MORBIDELLI, M. , SERVIDA, A., STORTI, G. and CARRÃ, S. Separation of xylenes on y zeolites 2 - Breakthrough curves and their interpretation, **Industrial Engineering Chemical Process Des. Development**, n. 21, p. 446-451, 1982.

- SCOPES, R.K., **Protein purification - principles and practice**, Springer-Verlag, New York, 1987, 329p.
- SKIDMORE, G.L., HORSTMANN, B.J., CHASE, H. A., Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF, **Journal of Chromatography**, v. 498, p. 113-128, 1990.
- SKIDMORE, G.L., CHASE, H. A., Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF, **Journal of Chromatography**, v. 505, p. 329-347, 1990.
- TAKUR, M.S., KARANTH, N.G., NAND, K., Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid-state fermentation, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 32, p. 409-413, 1990.
- THOMAS, H.C., Heterogeneous ion exchange in a flowing system, **Journal of American Chemical Society**, v.66, p. 1664-1666, 1944.
- VAN DER LAAN, E. Th. Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing in flow (O. LEVENSPIEL and W.K. SMITH), **Chemical Engineering Science**, 7, p.187-191, 1957.
- VILLADSEN, J. e MICHELSEN, M.L., **Solution of differential equation models by polynomial approximation**, Prentice Hall Inc, New Jersey, 1978, 445p.
- VOET, D. e VOET, J.G., **Biochemistry**, John Wiley & Sons, New York, 1995, 1360p.
- WHEELWRIGHT, S.M., **Protein purification: Design and scale up of downstream processing**, Oxford University Press, 1991.
- WHITAKER, J.R., **Principles of enzymology for the food sciences**, Marcel Dekker Inc, New York, 1972, 636p.
- YAO, CHUNCAI; TIEN, CHI, Approximation of intraparticle mass transfer in adsorption processes II - non-linear systems, **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 2, p. 465-473, 1992.